

SÉRIE A, N° 1990

N° D'ORDRE . 2857

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

PIERRE HEITZMANN

ANCIEN ÉLÈVE DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE
AGRÉGÉ DES SCIENCES PHYSIQUES

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FERMENTATION β -HYDROXY-BUTYRIQUE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **Avril 1942** devant la Commission d'Examen.

MM. M. JAVILLIER . *Président.*
E. AUBEL . . . } *Examineurs.*
J. CABANNES . }

PARIS

ANC^NE IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

1, RUE CASSETTE, 1

—
1942

HEITZMANN (Pierre). — Contribution à l'étude de la fermentation β -hydroxybutyrique. — *Paris, Anc^{ne} Imprimerie de la Cour d'Appel*, 1942, in-8°, 68 p.

Th. Sc. ph., Paris, 1942, n° 2857.

HEITZMANN (Pierre). — Contribution à l'étude de la fermentation β -hydroxybutyrique. — *Paris, Anc^{ne} Imprimerie de la Cour d'Appel*, 1942, in-8°, 68 p.

Th. Sc. ph., Paris, 1942, n° 2857.

HEITZMANN (Pierre). — Contribution à l'étude de la fermentation β -hydroxybutyrique. — *Paris, Anc^{ne} Imprimerie de la Cour d'Appel*, 1942, in-8°, 68 p.

Th. Sc. ph., Paris, 1942, n° 2857.

HEITZMANN (Pierre). — Contribution à l'étude de la fermentation β -hydroxybutyrique. — *Paris, Anc^{ne} Imprimerie de la Cour d'Appel*, 1942, in-8°, 68 p.

Th. Sc. ph., Paris, 1942, n° 2857.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

PIERRE HEITZMANN

ANCIEN ÉLÈVE DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE
AGRÉGÉ DES SCIENCES PHYSIQUES

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FERMENTATION β -HYDROXY-BUTYRIQUE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **Avril 1942** devant la Commission d'Examen.

MM. M. JAVILLIER . *Président.*

E. AUBEL . . . } *Examineurs.*
J. CABANNES . }

PARIS

ANCIENNE IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

1, RUE CASSETTE, 1

1942

SÉRIE A, N° 1990

N° D'ORDRE : 2857

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

PIERRE HEITZMANN

ANCIEN ÉLÈVE DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE
AGRÉGÉ DES SCIENCES PHYSIQUES

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FERMENTATION β -HYDROXY-BUTYRIQUE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **Avril 1942** devant la Commission d'Examen.

MM. M. JAVILLIER . *Président.*
E. AUBEL . . . } *Examineurs.*
J. CABANNES . }

PARIS

ANC^N IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

1, RUE CASSETTE, 1

1942

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyens honoraires. . . . } M. MOLLIARD.
C. MAURAIN.

Doyen. Paul MONTEL, *Professeur*, Théorie des fonctions.

<i>Professeurs honoraires.</i>	LÉON BRILLOUIN.	PORTIER.	DUBOSQ.	A. COTTON.
	PÉCHARD.	LAPICQUE.	BOHN.	J. DRACH.
	AUGER.	G. BERTRAND.	RABAUD.	M. GUICHARD.
	DANGEARD.	Ch. FABRY.	CAULLERY.	M ^{me} RAMART-LUCAS
	LESPIEAU.	LÉON BERTRAND.	CARTAN.	LABROUSTE.
	VESSIOT.	WINTREBERT.	É. BOREL	

PROFESSEURS



Charles PÉREZ.	T	Zoologie.	TOUSSAINT	Technique Aéronautique.
L. BLARINGHEM.	T	Botanique.	M. CURIE	Physique (P. C. B.).
G. JULIA.	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	G. RIBAUD.	T Hautes températures.
C. MAUGUIN	T	Minéralogie.	CHAZY.	T Mécanique rationnelle.
A. DENJOY.	T	Géométrie supérieure.	GAULT.	Chimie (P. C. B.).
L. LUTAUD.	T	Géographie physique et géologie dynamique.	CROZE.	Recherches physiques.
G. BRUHAT.	T	Physique.	DUPONT	T Théories chimiques.
E. DARMOIS	T	Enseignement de physique.	VALIRON.	T Calcul différentiel et intégral.
A. DEBIERNE	T	Physique générale et Radioactivité.	BARRABÉ.	Géologie structurale et géologie appliquée.
A. DUFOUR.	T	Physique (P. C. B.).	MILLOT	Biologie animale (P. C. B.).
L. DUNOYER	T	Chimie physique.	F. PERRIN	Théories physiques.
M. JAVILLIER.	T	Chimie biologique.	VAVON.	T Analyse et mesures chimiques.
Henri VILLAT	T	Mécanique des fluides et applications.	G. DARMOIS	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
Ch. JACOB.	T	Géologie.	CHATTON.	T Biologie maritime.
P. PASCAL.	T	Chimie générale.	AUBEL.	Chimie biologique.
M. FRÉCHET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.	Jacques BOURCART.	Géographie physique et Géologie dynamique.
E. ESCLANGON	T	Astronomie.	M ^{me} JOLIO-CURIE.	Physique générale et Radioactivité.
H. BÉGHIN.	T	Mécanique physique et expérimentale.	PLANTFOL	Biologie végétale (P. C. B.).
FOCH	T	Mécanique expérimentale des fluides.	CABANNES	T Recherches physiques.
PAUTHENIER		Physique (P. C. B.).	GRASSE	T Zoologie (Évolution des êtres organisés).
De BROGLIE	T	Théories physiques.	PRÉVOST.	Chimie organique.
CHRÉTIEN		Optique appliquée.	BOULIGAND.	Mathématiques.
PRENANT.	T	Anatomie et histologie comparées.	CHAUDRON.	Chimie (P. C. B.).
VILLEY		Mécanique physique et expérimentale.	WYART	Minéralogie.
COMBES	T	Physiologie végétale.	TEISSIER.	Zoologie.
GARNIER.	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	MANGENOT.	Biologie végétale (P. C. B.).
PÈRES.		Mécanique rationnelle.	P. AUGER	Physique.
HACKSPILL.	T	Chimie minérale.	MONNIER.	Physiologie générale.
			PIVETEAU	Géologie.
			ROCARD.	Physique.
			H. CARTAN.	Calcul différentiel.

Secrétaire. A. PACAUD.
Secrétaire honoraire. D. TOMBECK.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MAURICE LEMOIGNE

CHEF DU SERVICE DES FERMENTATIONS A L'INSTITUT PASTEUR

MEMBRE DE L'ACADÉMIE D'AGRICULTURE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE LA

FERMENTATION β -HYDROXYBUTYRIQUE

INTRODUCTION

La présence de l'acide β -hydroxybutyrique dans l'urine a été signalée par Külz et Minkowsky. On le trouve en grandes quantités, ainsi que l'acétone et l'acide acétylacétique, dans l'urine des diabétiques, et on a eu l'habitude de grouper ces trois corps qui sont considérés comme des produits anormaux du métabolisme animal sous le terme impropre de corps acétoniques.

On savait qu'une alimentation pauvre en glucides, riche en graisses, provoquait chez le malade une acétonurie marquée que l'on attribuait soit au manque de glucides, soit à un mécanisme dérégulé où les glucides pourraient intervenir. Toutes les premières études se rattachaient à la clinique du diabète et ont surtout fait entrevoir la complexité du phénomène.

Il revient à Lemoigne (1, 2) d'avoir montré que la production d'acide β -hydroxybutyrique n'était pas seulement le propre des organismes supérieurs mais pouvait aussi se produire par fermentation bactérienne à partir du glucose.

Un bacille voisin du *B. megatherium* que nous désignerons dorénavant sous le nom de bacille M (2 bis) est capable d'accu-

(1) LEMOIGNE, C. R., 1923, **176**, 1761.

(2) LEMOIGNE, ces *Annales*, 1925, **39**, 144.

(2 bis) Lemoigne a trouvé le bacille M dans presque toutes les terres dont il a effectué l'analyse bactériologique. C'est un bacille sporulé restant coloré par la méthode de Gram. Il liquéfie rapidement la gélatine ainsi que la caséine qu'il précipite du lait. Cette dernière digestion se fait, contrai-

muler en lui-même un corps cristallisable (3, 4) facilement soluble dans le chloroforme, appelé « Corps Y », de formule brute $(C_4H_6O_2)_n$. C'est un polymère de l'acide crotonique qui redonne cet acide et de l'acide β -hydroxybutyrique par hydrolyse alcaline.

Le corps Y qui forme jusqu'à 26 p. 100 du poids sec des bacilles M peut être considéré comme une matière de réserve assimilable. Sa désintégration biologique libère de l'acide β -hydroxybutyrique que M. Lemoigne a isolé presque à l'état pur dans les liquides d'autolysat des bacilles M. Cet acide est optiquement actif et dévie à gauche le plan de polarisation de la lumière comme celui que l'on isole à partir de l'urine. L'autolyse se produit lorsque les corps bactériens sont mis en émulsion dans l'eau à la température des réactions biologiques. A 30°, elle dure plusieurs jours.

Une même origine et l'interdépendance des corps cétoniques ne fait aucun doute. Si l'on a soutenu que le précurseur de l'acide β -hydroxybutyrique était uniquement l'acide butyrique qui s'oxyderait en β suivant la règle de Knoop, on a vu que les corps cétoniques sont aussi formés à partir des composés à deux et trois atomes de carbone comme cela fut d'abord démontré avec le foie par les travaux de Embden et de son école.

Embden et Oppenheimer (5) montrent que la perfusion du foie avec l'acide pyruvique donne une augmentation de la formation d'acide acétylacétique. Annau (6) et Edson (7) travaillant avec du foie en coupes ou haché confirment ce résultat. Loeb (8) dans les laboratoires de Embden montre que l'acide acétique accroît la proportion d'acide acétylacétique dans le foie, effet qui est prononcé selon Friedmann (9) dans le foie des animaux en état d'inanition. Weil-Malherbe (10) rapporte la formation d'acide acétylacétique à partir de l'acide pyruvique dans le tissu cérébral.

Dans le foie se trouve une diastase isolée par Dakin et Wakeman (11) transformant l'acide β -hydroxybutyrique en acide acétylacétique. Plus récemment Green, Dewan, Leloir (12) ont préparé

rement à ce qui se produit avec la plupart des bacilles sporulés, en milieu fortement acide. Aérobie strict, le bacille M ne forme pas de voile, il pousse très mal dans les milieux liquides. Au contraire, dans les milieux solides, en surface, il donne des cultures extrêmement abondantes.

(3) LEMOIGNE, *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1926, **8**, 770.

(4) LEMOIGNE, ces *Annales*, 1927, **41**, 148.

(5) EMBDEN et OPPENHEIMER, *Bioch. Z.*, 1913, **55**, 535.

(6) ANNAU, *Hopp. Seyl. Z.*, 1934, **224**, 141.

(7) EDSON, *Bioch. J.*, 1935, **29**, 2082.

(8) LOEB, *Bioch. Z.*, 1912, **47**, 118.

(9) FRIEDMANN, *Bioch. Z.*, 1913, **55**, 436.

(10) WEIL-MALHERBE, *J. Soc. Chem. Ind. Lond.*, 1936, **55**, 838.

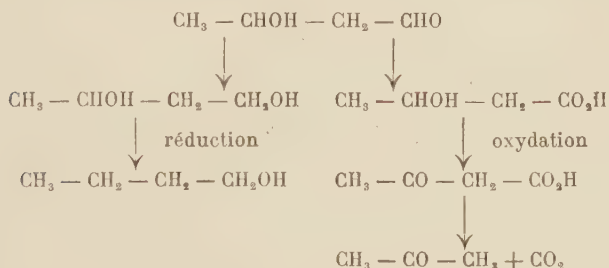
(11) WAKEMAN et DAKIN, *J. Biol. Chem.*, 1909, **6**, 373.

(12) GREEN, DEWAN, LELOIR, *Bioch. J.*, 1937, **31**, 934.

cette déshydrogénase à partir du muscle cardiaque et ont montré que le coenzyme I (nucléotide diphosphopyridinique) était un complément nécessaire. Mais le *Clostridium acetobutylicum*, qui est capable de décarboxyler l'acide acétylacétique [Johnson, Peterson, Fred (13)] pour donner de l'acétone, est inactif vis-à-vis de l'acide β -hydroxybutyrique.

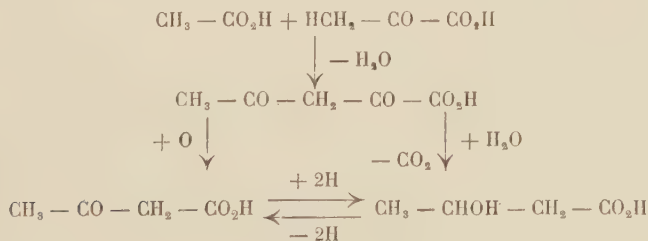
Ecrire des formules et schématiser par des réactions les transformations qui se produisent dans la matière vivante est certes plus aisé que d'en démontrer l'existence et d'en dominer le mécanisme. Les hypothèses sont néanmoins nécessaires pour diriger les investigations.

L'origine aldolique de l'acide β -hydroxybutyrique (l'alcool subissant une réaction de Cannizzaro suivant le schéma ci-dessous), se heurte à de sérieuses objections.



L'aldol qui se forme très facilement *in vitro* par action d'un alcali sur l'aldéhyde n'a jamais pu être préparé par voie biologique malgré de nombreuses tentatives.

Krebs (14), au contraire, envisagerait une origine pyruvique de cet acide par formation intermédiaire d'acide acétopyruvique.



Bien que l'acide β -hydroxybutyrique ait été caractérisé par une réaction aussi peu spécifique que celle de Van Slyke-Denigès,

(13) JOHNSON, PETERSON, FRED, *J. Biol. Chem.*, 1933, **104**, 145.

(14) KREBS et JOHNSON, *Bioch. J.*, 1937, **31**, 645 et 772.

l'activité biologique de l'acide acétopyruvique et sa transformation en acide acétylacétique n'en a pas moins été démontrée. Cette théorie se rattache au chaînon pyruvique bien connu et au chaînon acide acétique. La réaction :



représente le métabolisme anaérobie principal de l'acide pyruvique dans le cerveau. Néanmoins, dans cette théorie il reste une grande part d'hypothèse. Peut-on généraliser ? et les choses se passent-elles ainsi avec le bacille M ?

Si les stades de dégradation des glucides sont bien connus en ce qui concerne les fermentations alcoolique et lactique, il n'en est pas de même des formations d'acétone, d'alcool butylique, d'acétylméthylcarbinol, etc...

Il nous a semblé qu'il serait intéressant de s'attacher au métabolisme glucidique du bacille M dont la spécificité déjà reconnue pourrait éclairer ce qui se passe dans l'organisme des animaux supérieurs où nous avons probablement une superposition plus grande des phénomènes. L'utilisation d'organismes inférieurs, *a priori* plus simples que la cellule d'un organe d'un être évolué, paraît indiquée pour ce genre de recherches.

Sur la proposition de M. Lemoigne, nous avons entrepris ce travail qui comprendra d'abord une recherche des produits intermédiaires du métabolisme du bacille M. Nous avons été ainsi amené à caractériser une oxydo-réduction entre le glucose et l'acide acétylacétique, oxydo-réduction que nous étudierons particulièrement des points de vue qualitatif et quantitatif. Une étude critique de certaines méthodes de dosage ainsi qu'une mise au point d'autres s'ajouteront à cet exposé.

PREMIÈRE PARTIE

Considérations sur le mécanisme des fermentations.

Avant d'aborder l'étude expérimentale, nous croyons nécessaire de donner un bref aperçu de nos connaissances actuelles sur le mécanisme des fermentations, afin de placer nos recherches dans le cadre de ces conceptions. Nous insisterons particulièrement sur les découvertes récentes qui nous ouvrent des horizons nouveaux dont nous aurons à faire état et nous préciserons les théories qui sont susceptibles de se rattacher à la glycolyse qui nous intéresse.

Toutefois, parler de glycolyse n'est pas encore très exact. Toute dégradation biologique du glucose n'existe pas en soi et pour soi, elle est couplée à la vie du ferment. Ce que Pasteur avait nettement mis en évidence dans la phrase célèbre : « La fermentation est la vie sans air ». Sera donc incomplet tout schéma de glycolyse où il ne sera pas fait mention de la contribution que cette dégradation apporte à la vie de la cellule, c'est-à-dire à sa reproduction ou à son travail. Transposant cette notion sur le plan thermodynamique, nous dirons que l'énergie utilisable qui disparaît dans cette opération n'est pas intégralement dégradée en chaleur, mais une partie doit nécessairement être utilisée pour des synthèses chimiques ou des travaux mécaniques. Aujourd'hui il paraît logique de supposer que cette énergie libre s'accumule et se transporte à l'aide des composés phosphorylés, l'acide créatine phosphorique serait un de ces composés dont la simple hydrolyse provoquerait la contraction musculaire.

En ce qui nous concerne, nous ferons abstraction de ce point de vue qui complique encore le problème et nous ne considérerons cette remarque que comme une parenthèse afin de dégager le terrain sur lequel nous nous placerons : celui des étapes de dégradation du glucose.

La découverte de l'hexosediphosphate par Harden et Young a

commencé à faire entrevoir qu'il existait entre le glucose et l'alcool, toute une série de composés intermédiaires jusque-là ignorés. Ces composés se transforment les uns dans les autres, parfois d'une manière réversible.

Nous voulons seulement mentionner les principes et les méthodes qui se sont révélés féconds dans ce domaine et qui peuvent être considérés comme des points de départ et des modèles pour ce genre de recherches.

Ce qu'il faut avoir dans l'esprit en abordant ces études, c'est que la glycolyse est une cascade de réactions enzymatiques, réactions distinctes les unes des autres par leur vitesse, leurs conditions de réalisation. A premier examen, on ne saisit que les produits finaux, mais il est possible d'en saisir d'autres intermédiaires par les moyens suivants :

C'est, premièrement, la comparaison des divers systèmes. Utilise-t-on un organisme tout entier, un organe particulier, une purée d'organe, un extrait obtenu par broyage, des cellules, des bactéries, un suc de macération ; chacune de ces préparations aux origines bien différentes est un complexe de ferments, mais sous cette diversité d'apparence se cache l'unité, l'harmonie qui règne au sein de la nature. Les mêmes ferments se retrouvent partout et nous sommes sûrs qu'en étudiant un processus, on étudie l'autre voisin.

Les organismes supérieurs sont le produit d'une longue évolution sélective, ils peuvent être considérés comme une harmonieuse synthèse de tous les êtres inférieurs et les phénomènes y seront forcément plus complexes.

On nous objectera toutefois que les tissus se prêtent bien à la constitution d'extraits où les enzymes passent facilement dans le milieu, alors que seule la levure de bière est capable de donner un suc de macération provoquant la fermentation alcoolique. Mais ce n'est là qu'un mirage. Toutes les enzymes ne sont pas solubles dans l'eau. Il y a des réactions biologiques qui ne peuvent se produire qu'en présence de matériaux organisés et c'est ce qui explique les insuccès pour produire des extraits bactériens. Warburg avait déjà attiré l'attention sur les « Atmungskörper », corpuscules microscopiques de la cellule dont la présence est nécessaire pour observer une respiration.

Banga, Ochoa, Peters (15) signalent que la pyruvate déshydrogenase de l'extrait de cerveau est contenue dans une partie séparable par centrifugation. Et nous-même, sous la direction de M. Meyerhof, avons pu montrer un phénomène analogue. Il n'y a rien d'étonnant à ce que certaines réactions biologiques ne puissent se produire que sur des édifices organisés de la cellule ou d'une partie de la cellule. La glycolyse aérobie est une série

(15) BANGA, OCHOA et PETERS, *Chimie and Industrie*, 1939, **58**, 470-471.

de réactions à potentiels d'oxydo-réduction très différents, dont les systèmes catalytiques ne peuvent coexister entre eux et ne sont pas toujours des protéines en milieu aqueux homogène. Certains de ceux-ci doivent forcément être matérialisés topographiquement dans la cellule. C'est là toute une chimie à créer, chimie de réactions hautement spécifiques dépendant de l'architecture de milieux dans lesquels il sera souvent difficile de voir clair et qui ne pourront être analysés par les méthodes utilisées jusqu'ici, méthodes que nous allons maintenant passer en revue. Nous voulons parler des fermentations déviées.

La fermentation alcoolique normale donne, avec un rendement de 98 p. 100, deux molécules d'alcool pour une molécule de glucose, ceci si on laisse le milieu s'acidifier normalement à pH 4-5. Au contraire, si l'on tamponne le milieu au pH de 6,8 en ajoutant de la craie, on change les conditions de fonctionnement des enzymes intracellulaires et on voit apparaître de l'acide pyruvique ainsi que de l'acide lactique. Cette découverte de Fernbach et Schoen (16, 17) a été le point de départ de nombreuses recherches et il est maintenant classique de considérer l'acide pyruvique comme l'intermédiaire indispensable de la formation d'alcool. La maîtrise du pH a permis de mettre en évidence un stade de la fermentation alcoolique.

Pour atteindre des résultats analogues, il est beaucoup d'autres procédés que personne n'ignore. C'est l'emploi des inhibiteurs ou poisons. Le toluène inhibe la déphosphorylation de l'hexosediphosphate, le fluorure, la transformation d'acide phosphoglycérique en acide phosphopyruvique, d'où la découverte de ce premier acide. La présence d'acide malonique permet l'accumulation d'acide succinique en inhibant la déshydrogénase de ce dernier. Citons encore l'acide monoiodacétique, des colorants comme le rouge congo ; ils sont pléiade. On a souvent attribué à ces poisons, dans des réactions diastasiques, des spécificités qu'ils n'ont pas toujours. Malgré tout, l'utilisation de ces inhibiteurs a été féconde ; mais il n'existe pas encore de théorie pour expliquer leur action et permettre de synthétiser dans quelques règles la somme de ces connaissances.

D'autres composés n'agissent pas comme poison mais forment des combinaisons avec certains intermédiaires. L'hydrazine capte les cétones, le sulfite empêche l'aldéhyde d'être réduit en alcool par suite de la formation stable d'un composé bisulfite.

Notons aussi que les éléments marqués, produits nouveaux de la chimie moderne ont donné des résultats intéressants. Le phosphore radio-actif a été employé pour étudier certaines transfor-

(16) FERNBACH et SCHOEN, *C. R.*, 1920, **170**, 764.

(17) FERNBACH et SCHOEN, *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 475.

mations et la réversibilité de l'hydrogénation de la cozymase par l'aldéhyde phosphoglycérique.

Ayant ainsi rapidement passé en revue les principales méthodes qui nous permettent de déceler et d'isoler des intermédiaires de la glycolyse, il nous faut examiner maintenant les divers genres de réactions qui peuvent se produire. Au fur et à mesure que l'on découvrait de nouveaux intermédiaires, on cherchait à isoler l'enzyme qui permettait leur transformation. C'est le problème de l'isolement des diastases. Il n'y a réellement que peu de temps qu'on les a séparées du complexe zymasique du suc de macération. Meyerhof et Warburg ont les premiers montré tout le parti que l'on pouvait tirer d'un tel matériel.

Dans ces complexes il y a premièrement des protéines dont certaines ont pu être obtenues à l'état cristallisé et qui catalysent des réactions d'isomérisation. Ainsi, sous l'influence d'une zymohexase, l'hexosediphosphate se transforme en deux molécules de triosephosphate ou bien, sous l'influence d'une protéine ferment (C) isolée par Kiessling (18) du suc de macération, nous avons l'équilibre :



Cette protéine se décompose même en deux fractions, une phosphorylante, une autre déphosphorylante.

A côté de ces réactions qui sont des isomérisations réversibles, il y a un second type qui nécessite la présence d'un coferment transporteur d'hydrogène. Ce sont des oxydo-réductions. Parfois le coferment est séparable par simple dialyse (cozymase), parfois, pour l'isoler, il faut utiliser d'autres procédés (19), c'est le cas du ferment jaune (alloxazine adénine dinucléotide). Comme réaction type nous citerons l'oxydo-réduction de la fermentation alcoolique.

La cozymase, en présence d'une protéine isolée à l'état cristallisé (Warburg et Christian) est hydrogénée par l'acide 1-3 glycéroaldéhydediphosphorique. Il a fallu isoler ce système à l'état de pureté pour que Negelein et Brömel (20) puissent mettre en évidence la formation intermédiaire de l'aldéhyde diphosphoglycérique et de l'acide diphosphoglycérique qui phosphoryle ensuite l'acide adénylique. La phosphorylation par l'acide phosphorique de l'aldéhyde phosphoglycérique diminue l'énergie libre qui apparaît dans la réduction de ce dernier composé, mais, par contre, cette réduction a pour effet d'augmenter l'énergie de la liaison avec l'acide phosphorique qui pourra alors passer sur

(18) KIESSLING, *Bioch. Z.*, 1939, **302**, 50.

(19) WARBURG et CHRISTIAN, *Bioch. Z.*, 1938, **298**, 150.

(20) NEGELEIN et BROMEL, *Bioch. Z.*, 1939, **301**, 135.

l'acide adénylique : il y a eu transport d'énergie à l'intérieur même de la molécule. A proprement parler, il n'y a pas de couplage, mais tout se passe comme s'il y en avait un. Et la cozymase est ainsi réduite avec un minimum de perte d'énergie chimique. Ce qui se conçoit d'ailleurs, car s'il en était autrement, l'enzyme s'échaufferait trop et risquerait d'être décomposée.

Evidemment on a aussi montré [Negelein et Wulff (21)] qu'il existait une protéine cristallisée permettant la réduction de l'acétaldéhyde par la cozymase hydrogénée.

Ces résultats nous montrent le rôle capital de l'acide phosphorique déjà mis en évidence par Parnas (22) et nous font entrevoir avec l'acide diphosphoglycérique un composé phosphorylé d'une labilité encore inconnue (ce serait un anhydride mixte de l'acide phosphoglycérique et de l'acide phosphorique). Ils justifieront, pour une large part, les hypothèses que nous émettrons à la fin de cet exposé. Mais nous serions incomplets si nous ne donnions pas un aperçu des divers cycles de transformation que nous connaissons.

Le schéma de la fermentation alcoolique, les mutations du glucose en hexosediphosphate, acide phosphoglycérique, acide pyruvique, aldéhyde, alcool sont trop connus pour que nous les reproduisions ici. Et le bacille M ne vit qu'en présence d'oxygène.

La dégradation aérobie du glucose n'a pas été aussi approfondie et nous ne possédons là-dessus que des connaissances fragmentaires. Evidemment la transformation d'acide pyruvique en acide acétique est aujourd'hui démontrée ; mais il n'existe pas de théorie rendant compte de la combustion totale du glucose ; quant à la resynthèse des glucides à partir de l'acide lactique, si elle est connue depuis les travaux de Meyerhof, nous n'en avons pas encore saisi le mécanisme profond.

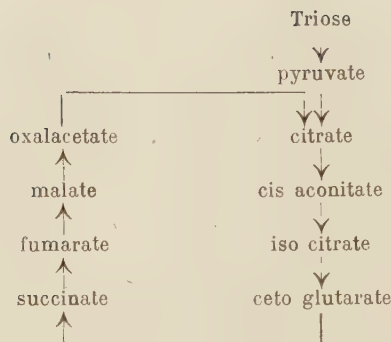
On n'a pas pu, dans cette dégradation, isoler stade par stade chacune des réactions. Malgré cela, les théories se sont donné libre cours. Szent Gyorgyi (23) cantonne la glycolyse à un transport d'hydrogène sur les accepteurs actuellement connus, acide fumarique, acide ascorbique, catéchol, cytochrome et enfin l'oxygène.

Serrant de plus près les faits, les recherches de Knoop et Martius, comme celles de Krebs, rendent vraisemblable l'union de l'acide pyruvique et de l'acide oxalacétique pour donner, après oxydation, de l'acide citrique ; lequel, par suite d'isomérisation, de réduction et de décarboxylation, redonnerait de l'acide oxalacétique qui retournerait dans le cycle figuré ci-dessous ou cycle d'acide citrique de Krebs :

(21) NEGELEIN et WULFF, *Bioch. Z.*, 1937, **289**, 436 et **293**, 351.

(22) PARNAS, *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1935, **17**, 698 ; 1936, **18**, 53.

(23) SZENT-GYORGYI, *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1938, **20**, 846.



Les transports d'hydrogène se font par le système fumarate oxalacétate de Szent-Gyorgyi, Krebs (24).

Ce schéma rend compte de l'oxydation totale d'une molécule de triose. Mais le métabolisme du pyruvate peut aussi se faire par l'intermédiaire de l'acide acétopyruvique (voir p. 3).

Bref, nous voyons qu'il existe certainement plusieurs modes de dégradation aérobie du glucose et que nos connaissances en cette matière sont assez restreintes.

Du point de vue énergétique, il a été entrevu que la respiration était couplée à une phosphorylation, Kalckar (25), ce qui a été confirmé par nos expériences (26). Mais les extraits tissulaires qui peuvent avoir une glycolyse aérobie sont-ils indiqués pour ces recherches ?

Dans la discussion que nous mènerons plus loin, nous verrons le parti qu'on peut tirer de toutes ces considérations.

Recherche de la phosphorylation.

La tendance actuelle (27) consiste à admettre que toute glycolyse est phosphorylante et qu'une oxydo-réduction aurait lieu entre la cozymase et l'aldéhyde phosphoglycérique. On a pu démontrer que cela pouvait se passer ainsi dans la levure, dans les tissus animaux (muscle, cerveau, tumeurs, embryon). On utilisait à cet effet soit des cellules intactes, soit plus fréquemment des extraits. Jusqu'à présent, seule la levure de bière séchée est capable de donner un suc de macération transformant comme la cellule vivante le glucose en alcool.

Le toluène et le fluorure inhibent la déphosphorylation et la

(24) KREBS, *Bioch. J.*, 1940, **34**, 775.

(25) KALCKAR, *Enzymologia*, 1939, **5**, 365 et *Nature*, 1938, **142**, 871.

(26) MEYERHOF, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 1100.

(27) MEYERHOF et PERDIGON, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 186.

transformation de l'acide phosphoglycérique en acide phosphopyruvique. Aussi (28), en empoisonnant la levure de bière par le toluène et le fluorure en présence de phosphate minéral, il y a accumulation de grandes quantités d'acide phosphoglycérique que l'on isole facilement. C'est en opérant de même avec des bactéries (*Citrobacter Freundii*, *Propioni Bacterium*, *aerobacter indologenes*, *B. subtilis*, etc.) que Werkmann et ses collaborateurs mettent en évidence la formation de cet acide. Celui-ci ne peut, par contre, être décelé avec *Clostridium butylicum*, *Cl. histolyticum*, *Cl. sporogenes*. Toutefois, même dans les cas les plus favorables, l'acide phosphoglycérique est obtenu en quantités moins grandes qu'avec la levure.

Nous nous sommes donc proposé de voir d'abord si le bacille M possédait, lui aussi, une glycolyse phosphorylante, en essayant simultanément une souche de *B. subtilis*.

A. PREMIERS ESSAIS. — Nous avons suivi exactement la technique indiquée par Stone et Werkmann (29). Mais nous avons utilisé pour doser le phosphore, des techniques plus précises :

7 g. de bacilles fraîchement récoltés sont émulsionnés avec 7 c. c. de tampon de phosphate 0,67 M (pH 6,85), 6 c. c. de glucose 20 p. 100, 0,1 c. c. $MgCl_2$ 1 p. 100 (volume final 35 c. c.), on ajoute 1 c. c. de toluène. Incubation quatre heures à 37° sous atmosphère d'azote. Après élimination des bacilles par centrifugation :

1° Nous avons mesuré la disparition de phosphore minéral. A cet effet nous utilisons la technique de de Lohmann et Jendrassik (30) avec le photocolorimètre de Meunier (31). Les résultats sont consignés dans le tableau I.

TABLEAU I.

	PHOSPHORE MINÉRAL en mgr. par cm ³ de l'émulsion utilisée, privée de bacilles	
	P avant incubation	P après incubation 4 heures à 37°
Bacille M.	4,95	4,95
Bacille <i>subtilis</i>	4,98	5,10

Aux erreurs d'expérience près, il n'y a pas disparition de P

(28) VERCELLONE et NEUBERG, *Bioch. Z.*, 1935, **280**, 161.

(29) STONE et WERKMANN, *Bioch. J.*, 1937, **31**, 1516.

(30) LOHMANN et JENDRASSIK, *Bioch. Z.*, 1926, **178**, 419.

(31) MEUNIER, *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1937, **49**, 113.

minéral, il semble, au contraire, que dans certains cas, l'hexose diphosphate est en partie déphosphorylé.

2° Après incubation, l'émulsion est centrifugée, on précipite le P minéral par $MgCl_2$ et NH_3 , la liqueur est ensuite acidulée par l'acide acétique et traitée par l'acétate de Ba. Le précipité qui se forme instantanément est centrifugé de suite. On laisse la liqueur douze heures à la glacière, comme après ce temps il ne se produit qu'un léger trouble, on ajoute 20 p. 100 d'alcool et après quarante-huit heures, on recueille le précipité formé.

Une grande partie de ce précipité est constituée de matières protéiques et ne se redissout pas dans HCl normal. Ce précipité n'est pas lavé, mais on dose le phosphore organique ainsi que le phosphore minéral après cent quatre-vingt minutes d'hydrolyse à 100° dans $HCl \frac{N}{4}$ (conditions dans lesquelles l'acide phosphoglycérique n'est pas hydrolysé) dans la solution chlorhydrique de ce précipité amené à 20 c. c.

Pour la totalité du précipité nous trouvons : tableau II.

TABLEAU II.

	P ORGANIQUE	P 180'	P ORG. — P 180'
	mgr.	mgr.	mgr.
Bacille M	0,109	0,071	0,038
Bacille <i>subtilis</i>	0,500	0,118	0,382

En admettant qu'on puisse considérer comme phosphore de l'acide phosphoglycérique, P org.-P 180', nous aurions isolé au plus :

0,4 mg. phosphoglycérate de Ba avec le bacille M.

4 mg. de phosphoglycérate de Ba avec le *B. subtilis* (alors que Werkmann en trouvait 98 mg.).

Dans ce dernier cas, nous avons déterminé l'exaltation du pouvoir rotatoire en présence de molybdate d'ammonium. On prend deux tiers de la solution initiale et un tiers de molybdate. Nous avons trouvé une augmentation de la rotation du plan de polarisation de la lumière de —0'6 au lieu de 4'7, si l'on admet qu'il y a 0,382 g. de phosphore, sous forme d'acide phosphoglycérique, pour la totalité du précipité.

Ces mesures sont presque à la limite des erreurs d'expérience et une racémisation a pu se produire. Mais le phosphore difficilement hydrolysable peut fort bien provenir d'un composé phosphorylé autre que l'acide phosphoglycérique. En faisant cette expérience dans les mêmes conditions avec de la levure de bière, nous avons obtenu une disparition de 2,46 mg. P par centimètre

cube de l'émulsion privée de levure, soit 47 p. 100 du P minéral total et nous avons isolé, pour 7 g. de levure, 302 mg. de phosphoglycérate de Ba.

B. AUTRES ESSAIS. — a) Nous avons obtenu toujours les mêmes résultats négatifs en utilisant des bacilles M qui ont été autolysés huit jours à l'étuve à 31°, ainsi qu'en partant de bacilles secs.

b) Comme la levure ou l'extrait de muscle, traités par l'acétone, donnent une poudre qui, dissoute dans l'eau, peut produire une glycolyse, nous avons pensé que les bacilles traités de même libéreraient aussi des cellules, des protéines et coferments capables de produire une phosphorylation en présence de fluorure et de glucose.

En fait la poudre d'acétone des bacilles, traitée par l'eau cède bien au liquide certaines protéines ; mais, après incubation de la poudre d'acétone du *B. subtilis* en présence d'une solution contenant phosphate, glucose, hexosediphosphate, fluorure, aldéhyde et acétylméthylcarbinol comme accepteur d'hydrogène (l'acétylméthylcarbinol est un produit du métabolisme du *B. subtilis* et peut être réduit par ce dernier en butylène glycol), il n'y a pas disparition de P minéral.

c) L'acide adénylpyrophosphorique, transporteur de phosphate dans la fermentation alcoolique, est inactif. Au contraire, il se déphosphoryle sans qu'il y ait, par ailleurs, accroissement du P organique.

Nous avons préparé l'acide adénylpyrophosphorique utilisé à partir du muscle de chien.

5 g. de *B. subtilis* (culture de quarante-huit heures sur moût de bière en boîte de Roux) sont lavés avec 75 c.c. d'eau. On centrifuge. Le culot de centrifugation est traité par 70 c.c. d'acétone refroidie à 0°. On centrifuge et on lave encore une fois le précipité à l'éther. On recentrifuge ce précipité et on le sèche sous vide.

Cette poudre sèche est émulsionnée avec 12 c.c. d'eau ; 5 c.c. de tampon de phosphate 0,45 M (pH 6,85), 2 c.c. glucose 20 p. 100, 1,5 c.c. aldéhyde 4,4 p. 100, 1 c.c. solution d'acétylméthylcarbinol, 3,2 c.c. FNa 2,1 p. 100, 1 goutte de $MgCl_2$ 20 p. 100.

A 12 c.c. de cette nouvelle émulsion on ajoute en plus de 0,5 c.c. de toluène, soit 0,5 c.c. d'eau, soit 0,5 c.c. d'une solution d'adénylpyrophosphate contenant 800 γ de phosphore facilement hydrolysable.

Ces deux parties, dont une portion est conservée à 0°, sont placées en atmosphère d'azote et mises au thermostat quatre heures à 31°. Après incubation, on traite par l'acide trichloracétique et on dose P dans la liqueur obtenue. Tableau III.

Nous pouvons pratiquement qualifier de négligeable la formation d'acide phosphoglycérique avec les deux bacilles que nous venons

TABEAU III.

PAR CM ³ D'ÉMULSION	P DIRECT TROUVÉ en mgr.	P FACILEMENT HYDROLYSABLE de l'acide adénylpyrophosphorique ajouté
Emulsion initiale.	2,56	
Emulsion après 4 h. à 31° .	2,58	
Emulsion après 4 h. à 31° .	2,66	0,060

d'examiner. Négatifs aussi les essais que nous avons pu faire en substituant avec le bacille M l'acétylacétate à l'acétaldéhyde.

On sait que la cozymase est le coferment nécessaire de cette dismutation. Sa présence en quantités aussi importantes que dans la levure a été signalée dans le *Streptococcus lactis*, le *B. casei*, le *B. propionicus*, alors qu'elle semble être absente dans le *B. acrogenes*, le *Penicillium* (32).

Elle se dose d'après le test suivant : on prend de la levure de bière séchée qu'on lave plusieurs fois avec de l'eau. Si à cette levure on ajoute du glucose, de l'hexose diphosphate et de la cozymase, la quantité de gaz carbonique dégagé est proportionnelle à la quantité de cozymase ajoutée. Pour que ces mesures aient un sens et soient reproductibles dans le temps, il faut spécifier les conditions et préparer la levure sèche toujours dans les mêmes conditions (32). En ce qui nous concerne, nous voulons simplement voir si la cozymase est présente dans nos bacilles et avoir un ordre de grandeur. Nous avons comparé la teneur de nos bacilles à la teneur d'une levure de bière de la Brasserie Demory. Nous avons utilisé la technique simplifiée de Ohlmeyer (33).

On prépare d'abord une émulsion de levure ou de bacilles qu'on porte rapidement à l'ébullition et que l'on refroidit aussitôt après.

On centrifuge. On tue ainsi les enzymes et on libère la cozymase à doser. Dans chacune des cupules de Warburg on place : 1° 1 c. c. d'émulsion de levure séchée (2 g. de levure sèche Demory lavés huit fois avec 80 c. c. d'eau et émulsionnés finalement avec 80 c. c.) ; 2° 0,2 c. c. du tampon de phosphate M/20, pH 6,5 contenant par centimètre cube 25 mg. de glucose, 20 mg. de phosphore sous forme d'hexosediphosphate et 40 γ de Magnésium sous forme de chlorure ; 3° 0,4 c. c. de liqueur à analyser.

On place les cupules dans le thermostat à 31° sous atmosphère d'azote à 10 p. 100 de CO₂ et on mesure les dégagements du gaz

(32) K. MYRECK, *Era. der Eng.*, 1933, **2**, 139.

(33) OHLMEYER, *Bioch. Z.*, 1936, **287**, 216.

carbonique dans l'état stationnaire de la quarantième à la cinquantième minute. Ce dégagement est proportionnel à la concentration en cozymase. Nos résultats sont consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV.

	POIDS FRAIS de bacilles ou de levure correspondant à 0,4 cm ³ de liqueur à analyser	CO ₂ dégagé de la 40 ^e à la 50 ^e minute en mm ³	TENEUR en cozymase par gr. frais
	mgr.		p. 100
Levure fraîche Demory	800	92	100
<i>B. subtilis</i> (culture fraîche de 48 h.).	800	57	62
Bacille M (culture fraîche de 24 h.)	800	63	68

Sommes-nous autorisés à conclure que, puisqu'il y a de la cozymase, il y a formation d'acide phosphoglycérique qui, dans nos expériences, n'aurait pu s'accumuler par suite d'une cause inconnue ? Non, la spécificité d'un ferment tient surtout à la protéine support. Rien ne s'oppose à ce que la cozymase intervienne dans d'autres oxydo-réductions que nous trouverons certainement par des recherches plus approfondies. Mais, auparavant, il importe de déterminer les produits secondaires autres que l'acide β -hydroxybutyrique que le bacille M est capable de produire à partir du glucose.

Oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique.

Devant les résultats négatifs obtenus dans la recherche d'une glycolyse phosphorylante, nous nous sommes demandé si le bacille M n'était pas capable de former de l'acide β -hydroxybutyrique aux dépens de l'acide acétylacétique. La disparition de ce dernier acide observée dans l'organisme des diabétiques se produit aussi avec la levure en l'absence de sucre, Lundin (34). Utilisant ces résultats, St. Weiss et M. Altaï (35) trouvent que l'acide acétylacétique disparaît en plus fortes proportions si du sucre est ajouté à la levure.

Mais il revient à Friedmann (36) d'avoir étudié de plus près ce phénomène. Cet auteur montre d'abord qu'avec la levure, l'acide acétylacétique est réduit et donne naissance à de l'acide

(34) LUNDIN, *Bioch. Z.*, 1923, **142**, 463.

(35) WEISS et ALTAÏ, *Zeitschr., exp. Med.*, 1925, **47**, 606.

(36) FRIEDMANN, *Bioch. Z.*, 1931, **243**, 125.

β -hydroxybutyrique déviant à droite le plan de polarisation de la lumière. Après avoir précisé les meilleures conditions dans lesquelles se fait cette oxydo-réduction, le pH optimum étant de 2 (à pH 6-8, l'activité est environ trois fois plus faible), il étudie l'influence des concentrations. Il en arrive à prendre 4 g. de levure pour 10 c. c. de liquide, une concentration en glucose de 20 p. 100 et en acide acétylacétique de 0,4 p. 100. Toutefois, il est à remarquer que la proportion d'acide acétylacétique transformé ne varie que dans de faibles limites (de 40 à 60 p. 100) avec ces deux dernières concentrations. Le toluol n'inhibe pas ces transformations.

D'une étude quantitative (37, 38, 39), il résulte que l'acide acétylacétique disparaît suivant deux processus. Le premier, c'est la formation d'acide β -hydroxybutyrique qui se forme en présence de sucre pendant les huit premières heures d'incubation (80 p. 100 sont ainsi transformées) et qui ne se produit pas en l'absence de sucre. C'est un processus lié à la fermentation. Le deuxième se superpose au premier, il est quatre fois plus lent et ne produit pas d'acide alcool. Il peut se poursuivre avec la même vitesse pendant quarante-huit heures.

Sur l'acide β -hydroxybutyrique que l'on dose par oxydation par le bichromate, il n'y en a que 62 à 66 p. 100 d'actif, par conséquent dosable par polarimétrie.

Friedmann n'apporte aucun éclaircissement sur le deuxième processus et n'examine pas si l'acétone qui provient de la décarboxylation de l'acide acétylacétique (20 à 30 p. 100 sont décarboxylés en seize heures) n'a pas été perdue au cours des traitements ou réduit pour donner naissance à de l'alcool isopropylique (40).

À côté de l'acide β -hydroxybutyrique, Friedmann trouve l'acide lactique qu'il attribuait à la présence d'un bacille lactique dans la levure de boulangerie du commerce qu'il utilisait. Pourtant, cet acide se rencontre souvent ; les mémoires le concernant sont trop nombreux pour que nous puissions les passer en revue ici. On le retrouve dans bien des fermentations, surtout quand on a soin de maintenir le pH du milieu au voisinage de la neutralité par un procédé quelconque. Fernbach et Schoen (41) démontrent la présence d'acide lactique à côté de l'acide pyruvique lorsqu'on ajoute de la craie à la levure. C'est aussi en utilisant cet artifice que Buchner et Meisenheimer (42), isolent l'acide lactique avec le

(37) E. FRIEDMANN, *Bioch. Z.*, 1932, **244**, 42.

(38) E. FRIEDMANN, *Bioch. Z.*, 1932, **244**, 57.

(39) E. FRIEDMANN, *Bioch. Z.*, 1932, **244**, 69.

(40) L'ANGLYKIE, PETERSON, FRED, *J. Bact.*, 1937, **34**, 443.

(41) *Loc. cit.*, n^{os} 16 et 17.

(42) BUCHNER et MEISENHEIMER, *Ber. D. Ch. G.*, 1908, **41**, 1410-1419.

B. butylicus de Fitz. Cet acide se retrouve aussi avec d'autres ferments butyriques, Neuberg et Arenstein (43) ; avec les ferments propioniques : Fitz (1880), Fromageot et Tatum (44), Phelps, Johnson et Peterson (45).

Aubel (46) signale la formation d'acide lactique par le *B. pyocyannique* et en étudie son métabolisme ainsi que celui de l'acide pyruvique (47).

L. F. Hewit (48) obtient de l'acide lactique avec le *streptocoque hémolytique*.

La chaîne des étapes de la fermentation lactique par l'intermédiaire de l'hexose diphosphate, de l'acide phosphoglycérique, l'acide pyruvique est désormais classique. Virtanen (49) isole, tout comme avec la levure, du zymophosphate avec le *B. casei* en présence de toluène. Mais il faut remarquer que l'acide lactique est aussi produit par des bacilles pour lesquels on n'a pas trouvé de glycolyse phosphorylante. Et nous pouvons nous poser la question de l'unité des fermentations lactiques ? Car justement nous allons voir que le bacille M, en présence de glucose, est capable de transformer l'acide acétylacétique en acide β -hydroxybutyrique gauche. Il se forme simultanément de l'acide lactique, production qui est liée, comme cela se dégagera de la deuxième partie de cet exposé, à l'oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique.

Avant d'aborder cette démonstration, nous voulons préciser quelques détails expérimentaux.

OBTENTION DES BACTÉRIES.

Pour toutes ces recherches, nous avons utilisé la souche M. L. du laboratoire des Fermentations qui était entretenue sur bouillon de haricot gélosé. Nous utilisons des cultures soit sur moût de bière, soit sur bouillon de haricots, milieux gélosés à 2 p. 100, et répandus dans des boîtes de Nicole de 25 x 30, à raison de 600 c. c. par boîte ou dans des boîtes de Petri de 9 cm. de diamètre à raison de 50 c. c. par boîte.

Le moût de bière était préparé d'après Lemoigne (50) : 2 kg. de farine de malt sont versés dans 10 litres d'eau à 45-48°. Cette température est maintenue une demi-heure puis élevée progres-

(43) NEUBERG et ARENSTEIN, *Bioch. Z.*, 1921, **117**, 269.

(44) FROMAGEOT et TATUM, *Bioch. Z.*, 1933, **267**, 360.

(45) PHELPS, JOHNSON, PETERSON, *Bioch. J.*, 1939, **33**, 1606.

(46) AUBEL, C. R., 1921, **173**, 1493.

(47) AUBEL, C. R., 1923, **176**, 332.

(48) L. F. HEWIT, *Bioch. J.*, 1932, **26**, 208-217.

(49) VIRTANEN, *Hopp. Seyl. Z.*, 1924, **138**, 136-143.

(50) *Loc. cit.*, n° 2.

sivement à 70° en trente minutes. On la laisse stationnaire pendant une demi-heure. Durant toute l'opération, on brasse constamment et on vérifie avec l'iode que la saccharification est terminée. Après filtration, le moût est amené à 10 litres avec les eaux de lavage. On ajoute 1,5 g. d'urée par litre.

Le bouillon de haricots se prépare à raison de 100 g. de haricots par litre. On y ajoute, pour ces quantités, 10 g. de peptone, 80 g. de saccharose. Une des principales difficultés de cette étude a été d'obtenir des cultures à développement constant. Les résultats sont certes meilleurs sur bouillon de haricots mais on obtient parfois une récolte donnant facilement avec de l'eau une émulsion qui est difficile à centrifuger.

Sur moût de bière on obtient une récolte d'aspect rugueux qu'il faut agiter avec des billes de verre et de l'eau pendant un quart d'heure pour avoir une émulsion homogène qui se centrifuge bien.

Mais, dans ce dernier cas, la masse des bactéries récoltées est beaucoup plus inconstante. Le bacille M ne se prête pas à des repiquages fréquents sur moût de bière. Le procédé qui nous a donné les meilleurs résultats a été le suivant : on part d'une souche vieille de plusieurs mois sur bouillon de haricots, qui, par conséquent, a complètement sporulé ; on la repique une fois sur un tube de moût gélosé qui, plusieurs jours après, nous servira à ensemençer nos boîtes.

PRÉPARATION DE L'ACÉTYLACÉTATE DE POTASSIUM.

La solution d'acétylacétate est préparée d'après Friedmann (51). On part de l'acétylacétate d'éthyle technique du commerce.

6 g. de potasse caustique sont dissous dans 200 c. c. d'eau, on ajoute 13 g. d'acétylacétate d'éthyle, on agite, on laisse une nuit. La liqueur est alors concentrée jusqu'à 100 c. c. sous le vide, pour éliminer l'alcool et l'acétone, en ayant soin que la température du bain entourant le ballon à distiller ne s'élève pas au-dessus de 37°. On vérifie la neutralité.

Cette solution se conserve des semaines à la glacière. Il est à remarquer d'ailleurs que la présence d'acétone qui peut se produire par décarboxylation spontanée ne gênera pas nos expériences, car nous employons toujours un excès de solution et l'acétone elle-même ne gêne pas.

CARACTÉRISATION DES ACIDES LACTIQUE ET β -HYDROXYBUTYRIQUE.

L'acide lactique et l'acide β -hydroxybutyrique sont deux acides non volatils de propriétés voisines, difficilement séparables, même

(51) *Loc. cit.*, n° 36.

par leurs sels. La caractérisation de l'acide β -hydroxybutyrique s'effectue facilement en le transformant en acétone ou en acide crotonique. L'acide lactique n'est pas seul à donner de l'aldéhyde par oxydation permanganique et sa meilleure identification repose sur l'isolement de son sel de zinc.

Pour séparer ces deux acides et les caractériser ensuite, Friedmann (52) utilise la formation d'éther méthylique. Celui de l'acide β -hydroxybutyrique bout à 67-69° sous 63 mm. et celui de l'acide lactique vers 40-44° sous 9 mm. Les deux éthers sont donc facilement séparables par distillation fractionnée. Cet auteur méthyloit à l'aide de diazométhane. Nous avons préparé ce corps par action de la nitrosométhylurée sur la soude (53). En cherchant à méthyler l'acide lactique, nous nous sommes aperçu que le rendement de cette réaction n'était que de 30 p. 100 et il est bien certain que toute racémisation n'est pas exclue.

Vu la petite quantité d'acide dont nous disposions, nous avons été obligé de renoncer à cette méthode.

Par chauffage, l'acide β -hydroxybutyrique se transforme en acide crotonique (54) tandis que l'acide lactique donne naissance entre 180 et 250° à des di- ou trilactides à partir desquels on régénère facilement l'acide primitif par hydrolyse de douze heures à 100° (55).

Par simple chauffage, il est donc possible de séparer l'acide lactique d'un mélange contenant de l'acide β -hydroxybutyrique.

100 g. de bacilles M (poids frais), récoltés d'une culture de vingt-trois heures sur 8 boîtes de Nicole contenant du bouillon de haricots gélosé à 80 g. de glucose par litre, sont émulsionnés avec 260 c. c. d'eau, 300 c. c. de ClK à 0,9 p. 100, 300 c. c. de bicarbonate de sodium à 5 p. 100. 100 c. c. acétylacétate 0,940 M et 40 c. c. de glucose à 20 p. 100.

On laisse incuber en agitant ce mélange pendant sept heures à 31° sous atmosphère d'azote à 10 p. 100 de CO₂.

L'extraction des acides organiques formés s'effectue suivant une technique classique. Le liquide séparé des bacilles par centrifugation est concentré sous pression réduite à petit volume. On ajoute de l'acide sulfurique de manière à maintenir le pH constamment à la neutralité. Le résidu sirupeux est acidulé jusqu'à réaction acide au rouge Congo avec de l'acide phosphorique (1 partie d'acide phosphorique de densité 1,7, 2 parties d'eau). On ajoute du sulfate de sodium sec de manière à constituer une pâte friable, que l'on extrait à l'éther pendant quarante-huit heures

(52) *Loc. cit.*, n° 36.

(53) *Organic Synthèses* XV, p. 48 et XV, p. 3.

(54) *Vislicenus, Zeitschr. Chim.*, 1869, 326.

(55) *Jungfleisch et Godchot, C. R.*, 1905, 140, 502.

dans un appareil Soxhlet. On chasse l'éther, le résidu est redissous dans 100 c. c. d'eau, on y ajoute un peu de noir animal, on filtre et on complète le filtrat avec les eaux de lavage à 200 c. c.

Par des méthodes que nous exposerons plus loin, nous avons trouvé que ce filtrat contenait :

4,2 g. acide β -hydroxybutyrique.

1,22 g. acide lactique.

La rotation observée dans un tube de 20 cm. est de $-57'$, cela correspondrait à une rotation spécifique, pour les 4,24 g. d'acide β -hydroxybutyrique présents dans la solution, de $22^{\circ}5$, chiffre adopté par Black (56).

L'acide lactique présent, s'il était actif, donnerait une rotation de $2^{\circ}8$.

Ceci nous prouve donc que l'acide β -hydroxybutyrique formé est de l'acide gauche ; car il n'y a vraisemblablement pas d'autres acides actifs dans la solution analysée.

Cette solution est ensuite purifiée par traitement à l'oxyde de plomb au bain-marie pendant une heure jusqu'à réaction alcaline. Après une nuit à la glacière, on filtre, on élimine le plomb par l'hydrogène sulfuré. On chasse par un courant d'air l'excès de H_2S . Ce traitement a pour effet d'éliminer des acides dont le sel de plomb est insoluble comme l'acide phosphorique, l'acide succinique, etc... On neutralise ensuite cette solution par de la soude et on la concentre sous vide presque à sec. On ajoute au résidu de l'acide phosphorique et du sulfate de soude sec comme précédemment. On extrait à l'éther la pâte obtenue, réduite en petits grumeaux, dans un appareil Soxhlet (durée de l'extraction huit heures), on obtient un résidu sirupeux que l'on met quelque temps dans un dessiccateur contenant de la potasse. Ce résidu est alors presque exclusivement constitué d'acide β -hydroxybutyrique et d'acide lactique qu'il s'agit d'identifier.

Avec un peu d'éther, nous transvasons le produit dans la partie A d'un tube en U en verre comportant deux petits ballonnets aux extrémités (fig. 1). On fait le vide et on scelle. On chauffe la partie A au bain de sable pendant six heures aux environs de $200-230^{\circ}$ jusqu'à ce qu'il ne distille plus d'acide crotonique. On a soin d'élever la température lentement de manière que la distillation ne soit pas brutale. La partie B plonge dans de l'eau glacée et l'on chauffe les parois latérales du tube à l'aide d'une flamme nue pour faire passer en B l'acide crotonique déposé. Au résidu qui n'a pas distillé, on ajoute 60 c. c. d'eau, et on maintient le tout douze heures au bain-marie à 100° , on y ajoute ensuite 1,5 g. de carbonate de zinc (57) et on laisse encore ce

(56) BLACK, *J. biol. Ch.*, 1908, 1909, **5**, 207.

(57) OPPENHEIMER, *Die Fermente*, 1929, **3**, 1265.

mélange douze heures au bain-marie. On filtre. Le filtrat est concentré à petit volume. On le laisse cristalliser trente-six heures à la glacière et on essore sur une assiette poreuse. On obtient 1,25 g. de cristaux jaunâtres assez impurs que l'on soumet à une nouvelle cristallisation fractionnée. On recueille ainsi des cristaux blancs

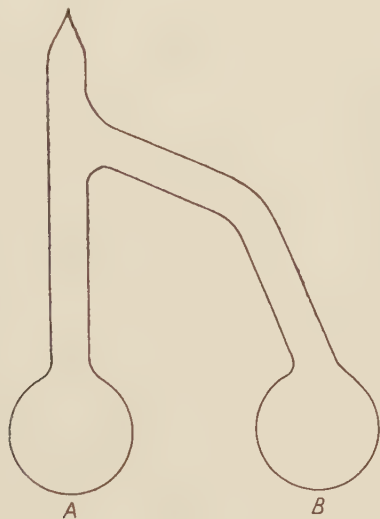


FIG. 1.

de lactate de zinc presque pur. Pour l'analyse, on les resoumet à une nouvelle cristallisation.

ANALYSE DU LACTATE DE ZINC. — La formule du *dl* lactate est $(C_3H_5O_3)_2Zn, 3H_2O$.

A. 0,1599 g. séchés à 110° perdent 0,0290 g. d'eau. H_2O p. 100 : trouvé 18,23, théorie 18,24.

B. Par calcination 0,1058 g. de ce sel donne 0,0288 g. ZnO p. 100 : trouvé 27,2, théorie 27,28.

C. On dose l'aldéhyde obtenue par oxydation au permanganate suivant la méthode de Furth et Charnas (voir page 39).

3,34 mg. sel donnent 0,94 mg. aldéhyde, théorie 0,99 mg.

Rendement 95 p. 100. Rendement de la méthode 97 p. 100 (voir page 39).

Le distillat presque complètement cristallisé est redissous dans l'éther. On sèche cette solution sur du sulfate de cuivre anhydre, on filtre. On chasse l'éther. Après essorage sur une assiette poreuse, on obtient 1,32 g. de cristaux d'acide crotonique presque pur (rendement 37 p. 100). Après une nouvelle cristallisation dans l'éther, ces cristaux fondent à 72° .

Indice d'acide :

Pour neutraliser 82,8 mg. il faut :

22,4 c. c. d'eau de chaux 0,0428 N/1
Théorie pour $\text{CH}_3 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CO}_2\text{H}$: 22,5

Ces résultats nous montrent donc qu'il se forme au cours de l'oxydo-réduction glucose acide acétylacétique, de l'acide lactique et de l'acide β -hydroxybutyrique.

Nous allons voir qu'il se forme aussi de l'acide acétique que nous avons éliminé précédemment par séchage du résidu acide dans un dessiccateur contenant de la potasse.

CARACTÉRISATION DE L'ACIDE ACÉTIQUE.

L'acide acétique se retrouve dans beaucoup de fermentations. Il est considéré comme provenant de l'oxydation de l'acide pyruvique. La cocarboxylase serait le groupement prosthétique de la déshydrase correspondante, Lipmann (58). Plus récemment, ce même auteur considère que cet acide apparaît sous la forme d'acétyl phosphate qui serait alors capable de phosphoryler l'acide adénylique (59).

Sa volatilité permet de l'isoler facilement d'un mélange et une courbe de Duclaux est suffisante pour les caractériser.

11 g. de bacilles M (récolte d'une culture de vingt-deux heures

TABEAU V.

VOLUME du distillat recueilli en c. c.	ACIDITÉ du distillat en c. c. eau de chaux 0,0423 N/1	ACIDITÉ exprimée en pour cent de l'acidité totale du distillat	
		Solution à analyser	Acide acétique (chiffres de Duclaux)
10.	0,8	6,3	7,4
20.	1,8	14,2	15,2
30.	2,85	22,15	23,4
40.	3,9	30,7	32
50.	5,1	40,2	40,9
60.	6,35	50,1	50,5
70.	7,7	60,7	60,6
80.	9,05	71,4	71,9
90.	10,7	84,4	84,4
100.	12,7	100	100

sur boîte de Nicole : moût de bière) sont lavés deux fois avec 55 c. c. ClK 0,9 p. 100. On les émulsionne avec 33 c. c. ClK 0,9 p. 100, 33 c. c. eau, 22 c. c. bicarbonate 5 p. 100, 11 c. c. glucose 10 p. 100, 11 c. c. acétylacétate de K 0,940 M/1. On laisse

(58) LIPMANN, *Enz.*, 1937, 4, 65.

(59) LIPMANN, *Nature*, 1939, 144, 381.

incuber le tout six heures à 31° sous atmosphère d'azote à 10 p. 100 CO₂. On centrifuge ensuite à froid.

A 50 c. c. de la liqueur obtenue, on ajoute 1,5 g. d'acide citrique et quelques gouttes d'huile de paraffine pour éviter les mousses. On distille et on entraîne le résidu par la vapeur d'eau.

Le distillat (200 c. c.) est neutralisé et concentré à 109 c. c. On le réacidule par 1 c. c. d'acide phosphorique à 50 p. 100. On en distille 100 c. c. que l'on complète à 110 c. c. Cette deuxième

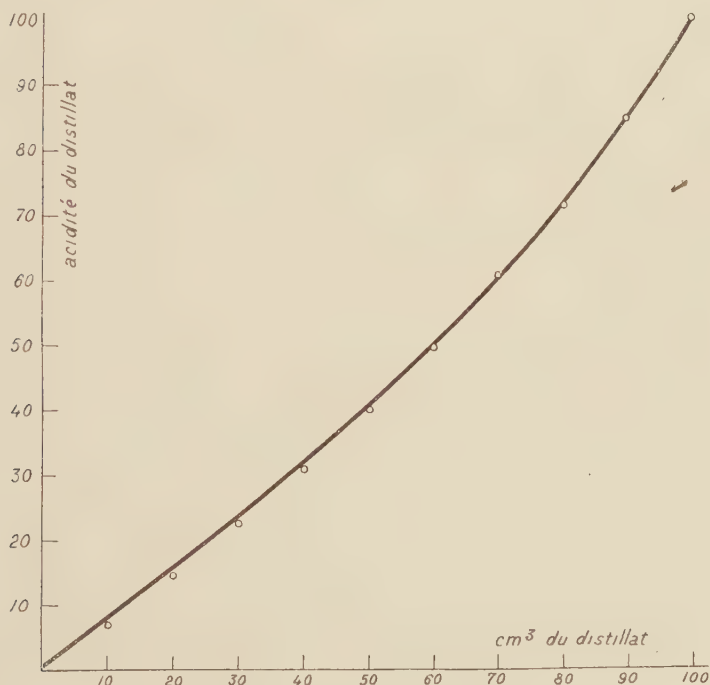


FIG. 2.

— Courbe donnée par Duclaux.
 o o Valeurs trouvées.

distillation est nécessaire pour éliminer l'acide lactique qui a été entraîné la première fois.

Les 110 c. c. ainsi obtenus sont soumis à une distillation suivant la méthode de Duclaux (60).

L'accord des chiffres trouvés (tableau V et fig. 2) avec ceux donnés par Duclaux pour l'acide acétique pur suffit pour notre démonstration.

(60) DUCLAUX, *Traité de Microbiologie*, 1900, 3, 384 et 1901, 4, 685.

Recherches d'autres acides. Isolement d'un corps cristallisable soluble dans le chloroforme fondant à 82°.

Se forme-t-il dans l'oxydo-réduction étudiée des acides autres que l'acide β -hydroxybutyrique, l'acide acétique, l'acide lactique ? Nous nous sommes posé ce problème et nous avons pensé aux acides en C_4 dicarboniques.

L'acide succinique est un produit secondaire de la fermentation alcoolique. Les acides malique et fumarique, entre lesquels existent un équilibre qui s'établit sous l'action d'une fumarase, sont aussi produits par les organismes inférieurs. L'*Aspergillus fumaricus* transforme une grande partie du sucre en fumarate de Ca, en présence d'oxygène et de craie : Wehmer (61).

Nous avons préparé les sels d'ammonium des acides extractibles par l'éther provenant de l'oxydo-réduction glucose acide acétylacétique. Ces sels chauffés avec de la poudre de zinc donnent du pyrrol qui rougit un morceau de bois imprégné d'acide chlorhydrique. La présence d'acides en C_4 dicarboniques ne saurait faire de doute, mais ils se trouvent en très petites quantités.

Pour déceler l'acide malique dans les acides extractibles par l'éther, nous avons mesuré l'exaltation du pouvoir rotatoire en présence d'acétate d'urane, Straub (62), ou de molybdate d'ammonium. Les différences trouvées étaient trop faibles pour qu'on puisse conclure à autre chose qu'à des traces.

L'acide succinique ne s'oxyde pas par le permanganate en milieu acide et nous l'avons recherché de la manière suivante : à la récolte d'une culture de vingt-trois heures sur 8 boîtes de Nicole, on ajoute 500 c. c. ClK 0,9 p. 100, 416 c. c. eau, 330 c. c. bicarbonate de Na 5 p. 100, 166 c. c. glucose 10 p. 100 et 166 c. c. acétylacétate de K 0,760 M/l. On laisse incuber six heures à 31° sous atmosphère d'azote et CO_2 . On garde le tout une nuit à la glacière et on centrifuge. Un litre du liquide obtenu est concentré sous pression réduite et on en extrait des acides quatre fois par l'éther en saturant la solution aqueuse de sulfate d'ammonium. La solution éthérée, séchée sur du sulfate de cuivre, donne, après évaporation de l'éther, un résidu que l'on étend d'eau, on y ajoute 6 c. c. d'acide sulfurique 10 N, on chauffe le tout dans une capsule au bain-marie et l'on verse MnO_4K N/10 jusqu'à coloration persistante. L'opération dure plusieurs heures (dix heures). On extrait ensuite cette liqueur par l'éther et on chasse l'éther. On obtient un résidu qui cristallise au bout d'une dizaine de jours. On essore les cristaux sur une assiette poreuse. On en obtient 190 mg. qui

(61) WEHMER, *Ber. D. Ch. G.*, 1918, **51**, 1663.

(62) STRAUB, *Hopp. S.*, 1936, **244**, 123.

se dissolvent dans 80 c. c. d'eau. On laisse cette solution une nuit à la glacière. Les cristaux déposés sont recueillis sur un filtre qu'on lave deux fois à l'eau et qu'on sèche à l'étuve. Les cristaux adhérents au filtre sont extraits par le chloroforme.

On obtient ainsi 40 mg. de cristaux peu solubles dans l'eau et l'éther, très solubles dans le chloroforme, ressemblant au corps Y isolé par Lemoigne (63) et donnant, comme ce dernier, lorsqu'on les chauffe, de l'acide crotonique reconnaissable à son aspect et à son odeur. Une deuxième cristallisation fractionnée dans l'eau effectuée sur 9 mg. nous a donné des cristaux fondant à 82°.

La petite quantité de produit dont nous disposions nous a empêché d'en faire une étude plus poussée. Mais il doit vraisemblablement s'agir là d'un produit de polymérisation de l'acide crotonique qui aurait un degré de polymérisation moindre que les corps isolés par Lemoigne dont les points de fusion sont 120° et 157°.

Quant à la présence d'acide succinique, nous pouvons répondre par la négative.

Production de l'acide acétylacétique par le bacille M.

Le bacille M produit toujours un peu d'acétone que Lemoigne (64) attribue à la décarboxylation de l'acide acétylacétique. Mais, à notre connaissance, la production de cet acide par des microorganismes n'avait pas encore été démontrée directement. En 1922, Renshaw et Fairbrother (65) signalent dans le distillat des cultures d'un microbe anaérobie facultatif, de l'alcool butylique normal, de l'acétone et des acides β -hydroxybutyrique et acétylacétique. Vu la stabilité de ce dernier acide, on peut être sceptique sur sa présence dans un distillat. En 1933, Johnson, Peterson et Fred (66) étudient les composés intermédiaires de la fermentation acétonobutylique, ils montrent bien la transformation par ce bacille de l'acide acétylacétique en acétone, mais ne parviennent pas à capter cet acide en partant du glucose.

Or l'acide acétylacétique, qui ne peut pas s'accumuler avec le ferment acétonobutylique qui contient une carboxylase très active, peut fort bien l'être avec le bacille M qui lui n'en contient pas. Pour le montrer, nous opérons de la manière suivante : 10 g. de bacilles M sont agités un quart d'heure avec des billes de verre et une solution de ClK à 0,9 p. 100 pour bien les émulsionner et désagréger les amas. On lave ces bacilles trois fois avec 150 c. c.

(63) *Loc. cit.*, nos 3 et 4.

(64) *Loc. cit.*, nos 3 et 4.

(65) RENSCHAW et FAIRBROTHER. *British. med. Journ.*, 1922, 674.

(66) *Loc. cit.*, n° 13.

de ClK et on les émulsionne avec 60 c.c. de ClK , 3,5 c.c. de phosphate 0,45 M (pH 6,83) et 8 c.c. de glucose 20 p. 100. On laisse incuber dans une fiole d'Erlenmeyer cette émulsion à 31° sous atmosphère d'oxygène. La fiole est agitée mécaniquement. Le pH du milieu diminue et tombe à 4,5 (durée d'incubation huit heures).

Le liquide privé de bacilles par centrifugation présente les caractères suivants :

1° Saturé de sulfate d'ammonium, en présence d'ammoniaque et de nitroprussiate, on obtient une coloration violacée intense. Cette coloration a presque complètement disparu si on a chauffé préalablement pendant cinq minutes au bain-marie la liqueur initiale.

2° Le corps donnant la réaction de Legal est extractible à l'éther seulement en milieu acide.

3° La cinétique de la réaction de Legal est exactement la même que celle de l'acide acétylacétique (voir p. 32).

4° A 30 c.c. de la liqueur on ajoute 3,3 c.c. SO_4H_2 10 N/1 et l'on extrait sept fois par l'éther. Il est nécessaire, lors de la première extraction, de centrifuger de manière à éliminer sous la forme d'une fine pellicule une substance amorphe insoluble, empêchant l'eau et l'éther de se séparer facilement après agitation.

L'éther est chassé sous vide. On obtient un résidu acide qui, repris par quelques centimètres cubes d'eau, donne la réaction de Legal et une coloration brune très franche avec le perchlorure de fer.

5° Le distillat de la liqueur donne la réaction à l'iodoforme et avec la dinitrophénylhydrazine une dinitrophénylhydrazone qui fond comme celle de l'acétone à 124°.

Ces caractères correspondent bien à ceux de l'acide acétylacétique.

Conclusion de la première partie.

Nous nous sommes attaché à déceler des intermédiaires de la glycolyse du bacille M. Nous avons d'abord mis en œuvre les artifices utilisés pour saisir des composés phosphorylés, mais en vain et nos résultats nous font mettre en doute ceux obtenus par Werkmann et ses collaborateurs. Dire que la glycolyse du bacille M n'est pas phosphorylante serait exagéré. Tout porte à croire cependant que celle-ci est intimement liée à l'organisation de la cellule, différente donc de la glycolyse en milieu liquide du suc de macération.

Nous avons ensuite vu qu'aux environs de pH 7, le bacille M était capable de réduire l'acide acétylacétique, cette réduction est différente de celle obtenue par Friedmann en ce qu'on obtient de

l'acide β -hydroxybutyrique gauche. Cela nous a amené à caractériser les produits de transformation du glucose liés à cette oxydation. Nous avons pu identifier les acides lactique et acétique et nous avons pu montrer que l'acide acétylacétique lui-même pouvait être formé par le bacille à partir du glucose. Les acides en C_4 dicarbonique ne se forment qu'à l'état de traces.

Les recherches ne sont pas encore assez avancées pour tenter une séparation des enzymes ou pour être rattachées par des liens solides aux théories existantes. Nous pouvons cependant nous demander si l'acide lactique obtenu se forme suivant les étapes classiques.

Bref, ceci constitue le premier stade de l'étude d'une fermentation. Le deuxième devra être une analyse quantitative des produits du métabolisme. C'est ce qui fera l'objet du chapitre suivant.

DEUXIEME PARTIE

Etude quantitative du métabolisme du glucose par bacille M.

Ayant déterminé qu'au cours de l'oxydo-réduction glucose acide acétylacétique, il se formait des acides β -hydroxybutyrique, lactique et acétique, nous allons entreprendre maintenant une étude quantitative de ce métabolisme. Cela va nous amener à présenter ici les méthodes de dosage que nous avons utilisées.

Certaines sont des méthodes classiques sur lesquelles nous n'insisterons pas. D'autres ont fait l'objet d'une étude plus minutieuse et nous leur donnerons ici tout le développement nécessaire.

MESURE DE L'ACIDITÉ FORMÉE.

Comme nous opérons en milieu bicarbonaté, l'acidité formée au cours de l'oxydo-réduction sera mesurée par le dégagement de gaz carbonique. Nous utiliserons pour cela la méthode de Warburg, mais il faut faire de suite deux remarques.

1° Le bicarbonate doit être en équilibre à pH 7 avec l'atmosphère. Il faudra donc remplir les cupules avec de l'azote à 10 p. 100 de gaz carbonique si l'on veut opérer en l'absence d'air, ou d'oxygène à 10 p. 100 de CO_2 si l'on veut opérer en aérobiose.

2° Du fait que nous sommes dans un milieu salin, l'acide formé ne libère pas la quantité correspondante de gaz carbonique. Il faut introduire ici un coefficient de rétention que nous déterminerons expérimentalement de la façon suivante : dans le diverticule latéral des cupules on introduit 0,2 c. c. d'une solution d'acide tartrique approximativement N/20.

Dans la première cupule on introduit 0,7 c. c. d'eau et 0,1 c. c. de bicarbonate de sodium 5 p. 100.

Dans la deuxième cupule on introduit un mélange qui sera analogue à la solution dans laquelle sont émulsionnés les bacilles lorsque l'on aura mélangé le contenu de la cupule et du diver-

ticule. Soit ici 0,3 c. c. ClK 0,9 p. 100, 0,2 c. c. bicarbonate 5 p. 100 et 0,3 c. c. eau distillée avec ou sans substrats. Les deux cupules sont remplies d'azote à 10 p. 100 de gaz carbonique. On les met dans le thermostat et une fois que l'équilibre de température est établi et que l'on a repéré la pression initiale, on mélange le contenu des cupules et des diverticules, on attend un quart d'heure que le nouvel équilibre soit établi et l'on repère la nouvelle pression. Le rapport de la quantité de CO₂ dégagé dans la première cupule à la quantité de CO₂ dégagé dans la deuxième cupule nous donne le coefficient de rétention. Nous trouvons pour ce dernier : 1,14 (tableau VI).

TABLEAU VI.

CONTENANCE des diverticules	CONTENANCE DES CUPULES	CO ₂ dégagé en mm ³ après mélange	COEFFICIENT de rétention
0,2 cm ³ acide tartrique.	0,1 bicarbonate 5 p. 100 + 0,7 c. c. eau.	201	»
<i>id.</i>	0,3 ClK 0,9 p. 100, 0,2 bicarbonate 5 p. 100, 0,3 eau.	178	1,13
<i>id.</i>	0,3 ClK 0,9 p. 100, 0,2 bicarbonate 5 p. 100, 0,3 eau.	175	1,15
<i>id.</i>	0,3 ClK 0,9 p. 100, 0,2 bicarbonate 5 p. 100, 0,3 eau + 16 mg. glucose.	180	1,11
<i>id.</i>	0,3 ClK 0,9 p. 100, 0,2 bicarbonate 5 p. 100, 0,2 eau + 10 mg. glucose + 7 mg. acide acétyl acétique.	176	1,14

On voit que le glucose et l'acide acétylacétique aux concentrations utilisées n'ont sur ce coefficient qu'une influence très faible.

Dans toutes les expériences qui suivront, nous prendrons donc toujours ces mêmes concentrations en ClK et en bicarbonate. Et la même valeur pour le coefficient de rétention : 1,14.

L'utilisation de solutions contenant des phosphates entraînerait un accroissement considérable de ce coefficient de rétention qui doit être voisin de l'unité si l'on veut que les mesures d'acidité aient un sens.

Ce coefficient de rétention est un terme correctif. Si la présence de bacilles influe sur sa valeur, celle-ci restera toujours dans la limite des erreurs d'expérience.

DOSAGE DU GLUCOSE.

Le glucose est dosé dans les liquides privés de bacilles par la méthode de G. Bertrand (67).

(67) B. BERTRAND et P. THOMAS, *Guide pour les manipulations de chimie biologique*, p. 85.

DOSAGE DE L'ACÉTONE, ET DE L'ACIDE ACÉTYLACÉTIQUE.

L'acide acétylacétique se décompose par la chaleur en acétone, cette décomposition se produit déjà à 30° d'une quantité mesurable. Aussi a-t-on l'habitude, comme l'acétone reste en général inaltéré, de mesurer la quantité d'acide acétylacétique disparue par la différence des mesures des quantités totales d'acétone provenant de l'acétone préformé et de la décomposition de l'acide acétylacétique.

Nous sommes donc ramenés à un dosage d'acétone que l'on effectue suivant J. Messinger (68).

Dans un ballon de 300 c. c. on met 4 c. c. de la solution à analyser contenant environ 8 mg. d'acétone. On ajoute 3 c. c. d'acide phosphorique (1 volume d'acide de densité 1,7 et 2 volumes d'eau) et 100 c. c. d'eau. Le tout est distillé avec un réfrigérant du type Schloessing-Aubin dont l'extrémité plonge dans une Erlenmeyer contenant quelques centimètres cubes d'eau. Cette fiole est refroidie par de l'eau glacée. On chauffe le ballon avec un bec Bunsen à pleine flamme et on laisse la distillation s'effectuer pendant vingt minutes. Au distillat on ajoute 5 c. c. KOH 2 N/1 et 10 c. c. iode N/10, on attend dix minutes, on acidule par 6 c. c. SO⁴H² 2 N/1 et on titre l'excès d'iode par une solution d'hypo-sulfite décinormale en présence d'empois d'amidon.

Il est nécessaire d'aciduler la solution d'acétylacétate pour que celui-ci soit décomposé rapidement.

DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTYLACÉTIQUE.

L'acide acétylacétique est dosé spécifiquement sous forme d'acétone après avoir éliminé l'acétone préformé comme suit : on sature la solution à analyser de chlorure de sodium, ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de l'acétone que l'on chasse alors par un courant d'air : c'est la technique de Folin (69).

On place la solution à analyser sous vide et l'on absorbe les vapeurs d'acétone par le réactif mercurique, c'est la technique de Fleury et Awad (70). Ces méthodes donnent d'excellents résultats mais sont longues à mettre en œuvre et se prêtent mal à des dosages en série.

On a aussi proposé (71, 72) de doser l'acide acétylacétique en mesurant par la technique de Warburg l'anhydride carbonique provenant de la décarboxylation de cet acide sous l'influence de

(68) J. MESSINGER, *B. der D. Ch. G.*, 1888, **21**, 3366.

(69) FOLIN, *J. Biol. chem.*, 1907, **3**, 177.

(70) FLEURY et AWAD, *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1926, **8**, 221 et 250.

(71) OSTERN, *Hopp. Sey.*, 1933, **218**, 160.

(72) EDSON, *Bioch. J.*, 1935, **29**, 2082.

l'aniline. Ce procédé qui n'est pas spécifique puisque l'acide oxalacétique donne la même réaction, se heurte aux mêmes objections que les premiers.

Nous avons cherché une méthode permettant d'obvier à ces inconvénients, quitte à perdre un peu sur la précision.

On sait que l'acide acétylacétique donne avec le nitroprussiate de sodium en présence d'ammoniaque une coloration grenat plus intense encore en présence de sulfate d'ammonium. C'est la réaction de Legal. Cette coloration n'est pas stable et n'avait pas encore été utilisée en vue de dosage pour la raison facile à comprendre d'ailleurs : c'est qu'on ne possédait pas de colorimètre permettant de mesurer rapidement un coefficient d'absorption.

Ce motif n'existe plus, car depuis quelque temps les appareils à cellule photo-électrique ont fait leur apparition et nous ne voulons citer que le photo-colorimètre de Meunier (73) avec lequel nous avons fait nos mesures.

Nous allons voir que cette réaction de Legal peut permettre des mesures comparatives à 1 p. 100 et des mesures absolues à 2-3 p. 100 près, si l'on a soin d'opérer toujours dans les mêmes conditions.

On prépare les réactifs suivants :

1° Une solution saturée de sulfate d'ammonium.

2° Une solution de nitroprussiate de sodium 4 p. 100 : on dissout 0,4 g. de nitroprussiate dans 2 c. c. d'eau et on ajoute de l'acide acétique pur jusqu'à 10 c. c. Cette solution est à utiliser de un à huit jours après sa confection.

3° Une solution d'ammoniaque à 20 p. 100 (solution commerciale).

Pour faire une mesure on met dans un tube à hémolyse : 0,5 c. c. du liquide à analyser contenant 50 à 90 γ d'acide acétylacétique. 4 c. c. de la solution de sulfate d'ammonium saturé.

0,2 c. c. de nitroprussiate 4 p. 100.

1 c. c. ammoniaque à 20 p. 100.

On agite, on attend quelques minutes, on transvase le contenu du tube dans la cuve du colorimètre et avec l'écran vert on fait la mesure de l'absorption exactement neuf à douze minutes après avoir versé l'ammoniaque. On peut facilement faire 4 dosages à la fois. Un contrôle sans acétylacétate nous donne le zéro de la cuve. La différence entre le nombre de divisions trouvées dans la mesure et le nombre trouvé pour le zéro est proportionnel à la quantité d'acide acétylacétique.

On étalonne le colorimètre en utilisant une solution fraîchement préparée d'acétylacétate dont le titre sera déterminé suivant Messinger (voir p. 30).

(73) *Loc. cit.*, n° 31.

Cette méthode rapide se justifie par les considérations expérimentales que nous allons exposer brièvement.

On peut suivre au colorimètre, en fonction du temps, l'intensité de la coloration. On obtient une courbe (fig. 3) qui possède un maximum pour un temps correspondant à onze minutes et demie. L'examen de cette courbe nous montre que, de la neuvième à la douzième minute, la coloration ne varie pas aux erreurs d'expé-

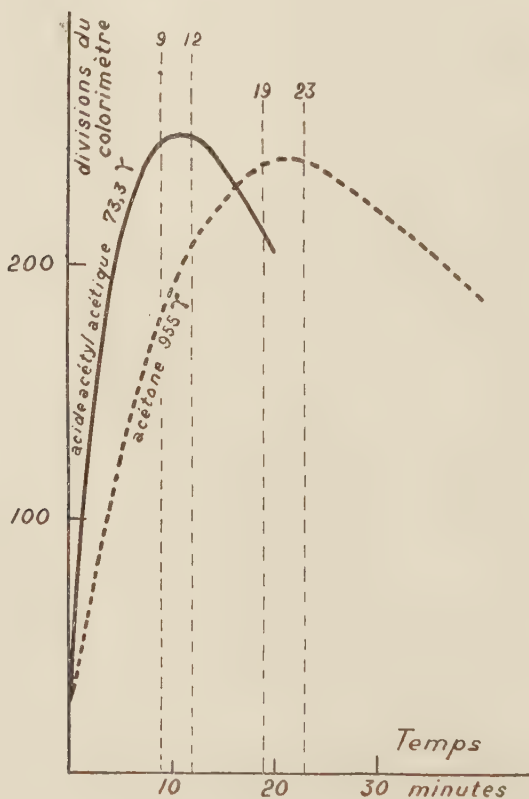


FIG. 3.

rience près. L'abscisse de ce maximum ne dépend pas de la concentration en acétylacétate. C'est donc à ce moment-là qu'il faut se placer pour faire les lectures. Dorénavant, lorsque nous parlerons d'intensité de coloration, c'est de ce maximum qu'il s'agira.

L'influence de la concentration en acide acétylacétique est résumée dans le tableau VII. On voit que la coloration suit la loi de Beer.

Il importe d'opérer toujours avec les mêmes quantités de réactifs. Et, si l'on veut faire des mesures absolues à 2 p. 100 près, il faut que la concentration en ammoniacque soit fixée à

TABLEAU VII.

ACIDE acétylacétique	DIVISIONS du colorimètre	DIVISIONS du colorimètre dues à l'acétylacétate	ACIDE acétylacétique pour une division du colorimètre
0	28	0	
36.6	441	113	0,324
73.2	252	224	0,326
91,5	312	284	0,322

5 p. 100 près, et celle de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 2 p. 100 ; celle du nitroprussiate pourrait par contre varier dans de plus larges limites.

La température à laquelle on opère, tout comme les concentrations en réactifs, a aussi son influence.

Si l'on veut appliquer la méthode, il faudra donc déterminer au préalable : 1° le temps au bout duquel se produit le maximum de la coloration ; 2° la valeur d'une division du colorimètre.

INFLUENCE DE L'ACÉTONE. — On sait que, comme l'acide acétylacétique, l'acétone donne la même coloration grenat avec le nitroprussiate en milieu ammoniacal, mais beaucoup plus faible. D'autre part, si l'on opère avec les quantités de réactifs utilisés ci-dessus, on voit que le maximum de coloration se produit seulement au bout de vingt et une minutes (fig. 3). Et, à concentration moléculaire égale, l'intensité de ce maximum est vingt-quatre fois plus faible avec l'acétone qu'avec l'acide acétylacétique. Ce rapport sera encore accru si l'on compare les colorations après un temps de neuf à douze minutes.

On voit donc que l'acétone ne gênera pas si elle est à une concentration moléculaire égale à la moitié de celle de l'acide acétylacétique. Cette condition sera réalisée dans nos expériences. L'aldéhyde éthylique donne aussi une coloration grenat avec le nitroprussiate, mais celle-ci est encore plus faible qu'avec l'acétone, elle ne pourra gêner nos résultats, car dans nos milieux l'aldéhyde se trouve encore dans de plus faibles proportions que l'acétone.

En résumé, le dosage de l'acide acétylacétique par la réaction de Legal sera particulièrement indiqué dans des recherches systématiques pour des mesures en série.

DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE.

C'est un acide volatil, entraînable par la vapeur d'eau, facilement identifiable par les courbes de Duclaux (74). Nous avons vu (p. 22) que c'était le seul acide volatil contenu dans nos émulsions bactériennes.

Nous l'isolons donc en distillant le liquide à analyser préalablement acidifié et en l'épuisant ensuite par la vapeur d'eau. Il est à remarquer que de cette façon un peu d'acide lactique sera entraîné. Dans nos expériences, il y en avait 4 à 5 p. 100. Pour éliminer cet acide, on pourrait le détruire par l'oxyde rouge de mercure suivant la méthode de Friedemann (75), mais outre que cette destruction est très lente, même à l'ébullition, cela complique le problème. On utilisera de préférence la remarque de Virtanen (76) qui note que si l'on distille 100 c. c. de 200 c. c. d'un mélange d'acide acétique et d'acide lactique, il ne passe pratiquement pas de ce dernier acide et la proportion d'acide acétique distillée est constante.

Nous avons vérifié cette méthode et nous opérons donc comme suit : à 30-60 c. c. de liqueur contenant environ 60 mg. d'acide acétique on ajoute 2 à 4 c. c. d'acide citrique à 40 p. 100. On distille jusqu'à obtenir un résidu de 10 c. c. que l'on extrait par la vapeur d'eau jusqu'à ce que le volume du distillat soit exactement de 200 c. c. (Il est nécessaire d'ajouter à la liqueur à distiller quelques gouttes d'huile de paraffine afin d'éviter les mousses.) Ces 200 c. c. sont versés dans une Erlenmeyer de 500 c. c., on en distille sans colonne 100 c. c. en vingt-huit minutes environ. On titre par l'eau de chaux l'acidité de ce dernier distillat qui représente 35,3 p. 100 de l'acide acétique contenu dans la liqueur à analyser.

La proportion d'acide lactique passant dans ce dernier distillat de 100 c. c. titrable par l'eau de chaux est moins de 1 p. 100 de l'acide lactique contenu dans les 200 c. c. du premier distillat.

DOSAGE DES ACIDES LACTIQUE ET β -HYDROXYBUTYRIQUE.

Les meilleures méthodes de dosage des acides lactique et β -hydroxybutyrique utilisent la propriété qu'ont ces acides de donner respectivement de l'aldéhyde et de l'acétone sous l'action de certains oxydants. Le rendement de ces oxydations dépendra naturellement des conditions expérimentales. Quoi qu'il en soit, le dosage d'un de ces acides se ramènera au dosage d'un mélange

(74) *Loc. cit.*, n° 60.

(75) FRIEDEMANN, *J. biol. Chem.*, 1938, **123**, 161.

(76) VIRTANEN, PULKKI, *J. Am. Soc.*, 1928, **50**, 3138.

d'aldéhyde et d'acétone. C'est ce dernier problème que nous allons d'abord étudier.

DOSAGE D'UN MÉLANGE D'ALDÉHYDE ET D'ACÉTONE. — L'aldéhyde possède toutes les propriétés de l'acétone, mais a, de plus, des propriétés réductrices qui permettent de le doser spécifiquement ou de l'éliminer.

Les réactions communes aux aldéhydes et aux cétones servant au dosage sont :

1° Formation d'une combinaison bisulfite par addition de bisulfite. La réaction n'est totale qu'avec l'aldéhyde (77, 78). Avec l'acétone, la quantité formée dépend des conditions opératoires (79). Nos essais nous ont montré qu'on aboutissait à un équilibre :



obéissant à la loi d'action de masse, de sorte qu'il est pratiquement impossible de doser avec cette méthode l'aldéhyde par différence, surtout si l'acétone est en grande quantités, et que, par conséquent, la méthode de Mondscheim (79) est à rejeter. Mais on comprendra aisément pourquoi, si l'acétone n'est pas en fortes proportions, l'aldéhyde entraîné par un courant d'air est seul retenu par une solution de bisulfite (voir p. 40).

2° Formation d'iodoforme par l'iode en milieu alcalin. C'est le procédé classique de dosage de l'acétone (80). Il faut 6 atomes d'iode pour une molécule d'acétone. Avec l'aldéhyde, la quantité d'iode disparu dépend des concentrations et de la température (81). Ce qui fait aussi rejeter cette méthode pour un dosage de l'aldéhyde par différence.

3° Formation d'une oxime par action de l'hydroxylamine. Cette méthode est assez peu employée. Il faut aussi définir les conditions expérimentales (82, 83).

4° Formation de dinitrophénylhydrazone par action de la dinitrophénylhydrazine.

Ces composés ont été surtout utilisés pour doser des acides cétoniques comme l'acide pyruvique. Ils se prêtent certainement très mal pour séparer l'aldéhyde de l'acétone.

Il résulte donc de ces considérations que nous n'avons qu'une seule méthode de dosage de l'acétone, c'est celle de Messinger.

(77) RIPPER, *Monath.*, 1900, **21**, 1079.

(78) CLAUSEN, *J. Biol. Ch.*, 1922, **52**, 263.

(79) MONDSCHIEIN, *Bioch. Z.*, 1912, **42**, 91.

(80) *Loc. cit.*, n° 68.

(81) FURTH et CHARNASS, *Bioch. Z.*, 1910, **26**, 199.

(82) LANGEDIJK, *Rec. Trav. Ch. des Pays-Bas*, 1927, **46**, 218.

(83) PALFRAY et TALLARD, *C. R.*, 1934, **199**, 296.

Si nous avons en plus de l'aldéhyde, il faudra l'éliminer en utilisant ses propriétés réductrices.

On a proposé dans ce but l'eau oxygénée et le peroxyde de sodium (84, 85), le réactif de Scott Wilson (86), l'oxyde d'argent ou la liqueur de Fehling (87). Par ces procédés il est nécessaire de porter la liqueur à l'ébullition. Malgré la présence d'un réfrigérant ascendant, une forte proportion d'acétone s'échappe (4 à 10 p. 100). Si on essayait de l'absorber, on retiendrait aussi l'aldéhyde qui se serait vaporisé avant d'être oxydé.

Le réactif de Nessler agit à froid. Son action a été étudiée par Bougault et Gros (88). Fleury et Awad (89, 90) en ont déduit une technique pour le dosage simultané de l'aldéhyde et de l'acétone. Mais cette méthode nécessite l'utilisation de petites quantités de liquide, 25 c. c., alors que nous aurons à doser l'acétone dans un distillat de 100 c. c. (voir p. 40) et l'utilisation d'une centrifugeuse. Des recherches que nous allons exposer nous ont montré que le réactif de Tollens qui se prête au dosage de l'aldéhyde (87) peut servir à éliminer celle-ci sans altérer l'acétone.

DESTRUCTION DE L'ALDÉHYDE PAR LE RÉACTIF DE TOLLENS. — Nous préparons la solution de nitrate d'argent ammoniacal ou réactif de Tollens suivant cet auteur (91). On dissout 3 gr. de nitrate d'argent dans 30 c. c. d'ammoniaque à 20 p. 100 et 3 gr. de soude fondue dans 30 c. c. d'eau. On mélange ensuite ces deux solutions. Le réactif ainsi obtenu se conserve des semaines à l'obscurité.

A 100 c. c. de solution d'aldéhyde placée dans un ballon de 300 c. c. qui servira à la distillation, on ajoute 4 c. c. de réactif de Tollens et 1 goutte de sulfate de Mn 4 p. 100. Ce dernier est nécessaire pour amorcer la réaction lorsque les quantités d'aldéhyde sont faibles (tableau VIII).

Au bout de quelques secondes, le précipité d'argent se forme, il peut adhérer aux parois. On laisse le mélange un quart d'heure à la température du laboratoire. On acidule ensuite par de l'acide phosphorique dilué trois fois de manière à amener le pH à une valeur inférieure à 4. On distille avec le réfrigérant de Schloëssing-Aubin comme dans le cas de l'acétone et on dose dans le distillat l'aldéhyde non détruit par le bisulfite avec une solution d'iode N/200 suivant la méthode de Clausen (92).

(84) OTTO FOLIN, *Laboratory Manual Biological chemistry*, 1929, 201.

(85) *Loc. cit.*, n° 38.

(86) LADISLAV KLING, *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1932, 14, 885.

(87) STEPP et FRIKE, *Hopp. Sey.*, 1921, 116, 298.

(88) BOUGAULT et GROS, *J. de Pharm. et de Ch.*, 1922, 26, 5.

(89) FLEURY et AWAD, *J. de Pharm. et de Ch.*, 1926, 3, 406 et 449.

(90) FLEURY et AWAD, *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1926, 8, 550.

(91) TOLLENS, *Ber. D. Ch. G.*, 1882, 15, 1635.

(92) PERDIGON, *Ann. des Ferm.*, 1941, 6, 143.

TABLEAU VIII.

ALDÉHYDE AJOUTÉ	ALDÉHYDE RETROUVÉ après action du réactif de Tollens	OBSERVATIONS
mgr.	mgr.	
22	0,07	
22	0,05	Sans SO ₄ Mn.
0,8	0,09	
0,4	0,17	
0,4	0,39	Sans SO ₄ Mn.
0,2	0,17	

L'examen du tableau VIII montre que l'attaque de l'aldéhyde par le réactif de Tollens n'est pas totale et qu'aux très faibles concentrations (2.10^{-6}) celle-ci n'a plus lieu. Quoi qu'il en soit, la quantité d'aldéhyde restant correspond à moins de 1 à 11 gouttes d'iode N/10, lorsqu'on traite le distillat par l'iode et la potasse. C'est une quantité négligeable qui n'influera pas comme nous allons le voir sur le dosage de l'acétone.

DOSAGE DE L'ACÉTONE EN PRÉSENCE D'ALDÉHYDE. — L'ammoniaque réagit sur l'acétone pour donner des produits de condensation : diacétonamine, triacétonamine (93), mais il faut remarquer que cette réaction ne s'effectue que par un chauffage de plusieurs heures à 100°. Nous avons vérifié que, dans les conditions où nous opérons, nous retrouvons intégralement 98 à 99 p. 100 de l'acétone ajoutée. En présence d'aldéhyde, celui-ci disparaît.

A 100 c. c. contenant de l'aldéhyde et de l'acétone, on ajoute du réactif de Tollens, 1 goutte de sulfate de Mn 4 p. 100. On laisse un quart d'heure à la température du laboratoire, on acidule ensuite par de l'acide phosphorique dilué trois fois. On dose l'acétone dans le distillat. (La solution d'acétone servant à ces essais a été titrée au préalable.)

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IX.

Nous voyons donc que cette méthode est assez rapide et donne de bons résultats pour le dosage d'acétone en présence d'aldéhyde et conviendra parfaitement pour le dosage d'acide β -hydroxybutyrique, d'autant plus que dans ce cas nous serons encore obligé d'adopter un coefficient expérimental pour le rendement de l'oxydation.

Nous verrons aussi que l'acide β -hydroxybutyrique ne gêne pas dans le dosage de l'acide lactique où l'aldéhyde est titré par le bisulfite. Néanmoins nous citerons ici, pour mémoire, les méthodes qui permettent de doser l'aldéhyde d'une manière spécifique. Ce sont :

(93) HEINTZ *Liebigs Ann.*, **174**, 154 ; **178**, 305 ; **183**, 276 ; **189**, 214 ; **203**, 336.

TABLEAU IX.

ALDÉHYDE ajouté en milligrammes	RÉACTIF de Tollens ajouté en c. c.	ACÉTONE ajoutée en milligrammes	ACÉTONE retrouvée en milligrammes	RENDEMENT p. 100
»	4	8,83	8,72	98,8
»	4	3,54	3,52	99,4
66	12	8,83	8,65	98
22	4	8,83	8,68	98,3
0,4	4	8,83	8,83	100

1° Les méthodes colorimétriques :

On utilise dans ce but le réactif de Schiff. La coloration obtenue est instable, il importe de spécifier minutieusement les conditions expérimentales. Paul (94), Tolman (95).

2° Les méthodes utilisant le pouvoir réducteur :

Si le réactif de Tollens a été utilisé (96), le réactif de Nessler paraît donner les meilleurs résultats (97). C'est la méthode de de Bougault et Gros (98) ou la technique de Fleury et Awad (99).

DOSAGE DE L'ACIDE LACTIQUE. — La meilleure méthode de dosage de l'acide lactique consiste à oxyder ce dernier par le permanganate. On obtient de l'aldéhyde qu'il est facile de titrer. Les modifications apportées à la méthode initiale de Furth et Charnas (100) ont eu pour but d'augmenter le rendement de la réaction et de permettre d'opérer sur de petites quantités d'acide lactique (1 à 2 mg.). Bourdeau (101) dose l'aldéhyde suivant la méthode de Bougault et Gros ; mais la précision obtenue est assez faible. En général, on entraîne l'aldéhyde par un courant d'air et on le retient par le bisulfite (102). L'acide β -hydroxybutyrique n'a qu'une influence négligeable sur ce dosage (103), il n'en serait pas de même de l'acide malique. Nous avons vérifié que, même dans la proportion d'une molécule d'acide lactique pour 17 d'acide β -hydroxybutyrique, les résultats étaient acceptables.

Notre technique est la suivante :

Nous avons utilisé un appareil de Franke avec un absorbeur à

(94) PAUL, *Z. Anal. Chem.*, 1896, **35**, 649.(95) TOLMAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 1906, **28**, 1624.(96) *Loc. cit.*, n° 87.(97) FABRE, *Bull. Soc. Ch. Biol.*, 1925, **7**, 429.(98) *Loc. cit.*, n° 88.(99) *Loc. cit.*, nos 89 et 90.(100) *Loc. cit.*, n° 81.(101) BOURDEAU, *J. de Pharm. et de Chimie*, 1934, **20**, 342.(102) *Loc. cit.*, n° 78.(103) FRIEDEMANN, COTONIO, SHAFFER, *J. Biol. Chem.*, 1927, **73**, 335.

verre fritté. La réaction n'est pas totale comme avec l'appareil de Lieb (104), que nous ne possédons pas. Les résultats en sont néanmoins fidèles et satisfaisants à condition d'admettre un rendement de 96,5 p. 100.

Nous mettons dans le ballon de 500 c. c. de l'appareil de Franke la solution à analyser contenant 1 à 2 mg. d'acide lactique, 10 c. c. SO_4Mn 10 p. 100, de l'eau jusqu'à la moitié du ballon, 4,5 c. c. d'acide phosphorique (acide de densité 1,7 étendu de deux fois son volume d'eau). On ajoute quelques grains de pierre ponce et du talc. L'appareil de Franke est relié à un barboteur à verre fritté de la maison Pyrex contenant :

3 c. c. métabisulfite de potassium 0,6 p. 100, 1 c. c. tampon d'acétate, 50 c. c. d'eau.

Le tampon d'acétate à pH 4,45 est composé de 15 parties d'acide acétique M/1 et 10 parties d'acétate de sodium M/1. On fait passer un courant d'air et on porte à l'ébullition. A ce moment, on verse dans l'ampoule à brome de l'appareil, du permanganate de K M/250 de manière que les gouttes soient juste séparées les unes des autres. Il faut ainsi verser 50 à 100 c. c. de permanganate en cinq à dix minutes. Le contenu du ballon doit prendre finalement une teinte brunâtre pas trop foncée, car le permanganate ne doit pas être en grand excès. On maintient l'ébullition quatorze minutes.

Au liquide du barboteur dont on a rincé la plaque de verre fritté, on ajoute IV gouttes d'empois d'amidon et de l'iode N/10 jusqu'à coloration bleue, on rajoute alors I goutte de bisulfite pour réduire l'excès d'iode, une pincée de talc et de l'iode N/200 (solution préparée le jour même à partir d'une solution N/10). Lorsque le virage est juste atteint, on ajoute une pincée de bicarbonate de sodium puis de l'iode N/200 jusqu'à nouvelle apparition de la teinte bleue. Soit V le volume d'iode ajouté, l'acide lactique correspond à

$$0,225 \times V \times \frac{96,5}{100} \text{ mg.}$$

Nos essais ont été effectués en prenant du lactate de zinc cristallisé à trois molécules d'eau et du β -hydroxybutyrate de sodium que nous avons préparé d'après la méthode de Vislicenus (105).

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau X.

Comme nous n'aurons jamais de très fortes proportions d'acide β -hydroxybutyrique, nous voyons donc que cette méthode sera applicable à condition d'adopter 96,5 p. 100 comme rendement de la réaction. Il est inutile dans notre cas de chercher à doser l'aldéhyde par une méthode spécifique.

(104) LIEB et ZICHERL, *Hopp. Sey.*, 1932, **211**, 211.

(105) VISLICENUS, *Liebigs Ann.*, 1869, **149**, 205.

TABLEAU X.

ACIDE β -hydroxy- rique ajouté en milligr.	ACIDE lactique ajouté en milligr.	ACIDE lactique retrouvé en milligr.	RENDEMENT p. 100	MOL. AC. β -HYDROXYBUTYRIQUE	
				MOL. AC. LACTIQUE	
0	2,06	1,99	96,7		
0	2,06	2,00	97,2		
0	0,916	0,888	97		
9,07	2,06	1,995	96,7		3,8
18,25	2,06	1,96	95		7,6
9,07	0,916	0,879	96		8,55
18,15	0,916	0,912	99,6		17,1
18,15	0	0,022			

DOSAGE DE L'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE. — La méthode de Shaffer (106) consiste à oxyder l'acide β -hydroxybutyrique par le bichromate en milieu sulfurique. Il y a formation d'acétone que l'on distille et que l'on dose. Le rendement dépend des conditions expérimentales, il n'est jamais de 100 p. 100 et il faudra en tenir compte dans les calculs. Il importe d'opérer toujours de la même manière. S'il y a de l'acide lactique, celui-ci libère de l'aldéhyde avec un rendement de 20 p. 100 (107). Nous l'éliminerons par le réactif de Tollens (p. 37).

La modification de Van Slyke (108) à la méthode de Shaffer ne ferait que compliquer les choses puisque l'aldéhyde précipite aussi avec le réactif mercurique. Quant aux méthodes utilisant la formation d'acide crotonique, elles sont encore moins précises (109, 110).

Nous opérons de la façon suivante :

Dans un ballon de 500 c. c., on met la solution à analyser complétée à 105 c. c., on ajoute 20 c. c. SO_4H_2 . 10 N. Le ballon est adapté à un réfrigérant de Schlössing-Aubin par un bouchon à deux trous. Par le deuxième trou passe une ampoule à brome contenant du bichromate de potassium 5 p. 100. On porte à l'ébullition, on verse alors XX gouttes de bichromate, environ 1 c. c. On maintient le liquide à faible ébullition pendant une demi-heure, on ajoute encore X ou XX gouttes de bichromate si l'on s'aperçoit à la coloration verte du liquide que tout ce sel est réduit et on distille ensuite 90 c. c. en trois quarts d'heure.

Il est bien entendu que l'extrémité du réfrigérant plonge au fond d'un ballon refroidi par de la glace contenant 10 à 20 c. c.

(106) SHAFER, *J. Biol. Chem.*, 1908, **5**, 211.

(107) *Loc. cit.*, n° 79.

(108) G. DENIGÈS, L. CHELLE et A. LABAT, *Précis de Chimie analyt.*, 507.

(109) STADELMANN, *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1883, **17**.

(110) DARMSTAEDTER, *Hopp. Sey.*, 1903, **37**, 355.

d'eau. On laisse le distillat reprendre la température du laboratoire, on le traite avec 4 c. c. de réactif de Tollens et 1 goutte de sulfate de Mn 4 p. 100. On laisse agir un quart d'heure. On acidule par l'acide phosphorique, on distille et on dose l'acétone dans ce distillat.

Nos essais ont été effectués à partir des solutions de lactate de Zn et de β -hydroxybutyrate de Na. Ils sont consignés dans le tableau XI.

TABLEAU XI.

ACIDE lactique ajouté en milligr.	ACIDE β -hydroxybutyrique ajouté en milligr.	ACIDE β -hydroxybutyrique trouvé en milligr. (d'ap. la quantité d'acétone)	RENDEMENT p. 100	MOLÉC. AC. LACTIQUE
				MOLÉC. AC. β -HYDROXYBUTYRIQUE
0	7,73	7,3	94	0
0	15,44	14,67	94	0
15	17,25	15,8	91,5	1
37,4	8,63	7,9	91,5	5
150	17,25	15	87	10

Dans ce procédé de dosage de l'acide β -hydroxybutyrique nous admettrons pour la formation d'acétone un rendement de 91 p. 100.

COMPLÉMENT AU DOSAGE DES ACIDES LACTIQUE ET β -HYDROXYBUTYRIQUE. — Nous aurons à doser l'acide lactique et l'acide β -hydroxybutyrique dans des mélanges contenant du glucose, de l'acétone et de l'acide acétylacétique. Ces derniers corps sont à éliminer, car leur présence au moment de l'oxydation pourrait entraîner des erreurs considérables. Le glucose s'élimine par la méthode classique de défécation au sulfate de cuivre et à la chaux : à 10 c. c. de la liqueur à analyser, on ajoute 5 c. c. de sulfate de cuivre 10 p. 100, 6 c. c. de lait de chaux 10 p. 100, on complète à 25 c. c. et on laisse en contact au moins demi-heure. On centrifuge. Le liquide surnageant servira au dosage des acides lactique et β -hydroxybutyrique, mais on aura soin une fois ces liqueurs étendues et acidulées de les faire bouillir sans réfrigérant pendant un quart d'heure pour éliminer l'acétone et l'acide acétylacétique. On compensera ensuite les pertes d'eau, puis on effectuera l'oxydation.

Oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique.

Dans son mémoire, Friedmann (111) s'est borné à déterminer les rapports existant entre l'acide acétylacétique disparu et l'acide

(111) *Loc. cit.*, nos 37, 38, 39.

β -hydroxybutyrique formé. Il n'a pas tenté de voir ce que devenait le glucose dans cette opération, omission d'ailleurs compréhensible car la levure pour cette étude est un organisme mal choisi : 1° Friedmann utilisait la levure de boulangerie du commerce qui n'est pas forcément une culture pure, ce qui fait qu'il pouvait attribuer l'acide lactique formé à une bactérie lactique ; 2° la levure fermente le glucose aussi bien, sinon mieux, en anaérobiose qu'en aérobiose, de sorte que les phénomènes se superposent et sont, par conséquent, difficiles à séparer, malgré l'addition de toluène ; 3° la quantité de levure utilisée est relativement considérable, 4 g. de levure fraîche pour 10 c. c. de liquide. La matière contenue dans la levure ne reste pas inactive, les substances de réserve peuvent en principe influencer de manière considérable dans un bilan. Le bacille M qui, nous le verrons, a une glycolyse très faible en anaérobiose et que l'on peut obtenir facilement en cultures pures est, au contraire, tout indiqué pour étudier les produits liés à l'oxydo-réduction qui existe entre le glucose et l'acide acétylacétique.

Faudra-t-il aussi s'attendre à pouvoir isoler ce phénomène et dresser un bilan exact ? Evidemment non. Toute cellule vivante, même si elle est dans un milieu dépourvu de toute matière nutritive, continue à respirer, elle brûle ses dernières matières de réserve en même temps qu'il s'effectue d'autres transformations intracellulaires, quand cela ne serait que la sporulation. A ces phénomènes vient s'ajouter celui de l'autolyse, Lemoigne (112). De même l'acétylacétate pourra disparaître en oxydant les matières de réserve que le glucose seul est peut-être capable de reconstituer en partie.

Néanmoins, nous trouverons dans l'action du bacille M sur le mélange glucose acide acétylacétique des différences appréciables avec les témoins pour en tirer des conclusions indiscutables. Dans nos expériences, en vue d'établir un bilan, nous séparons par centrifugation les bacilles du liquide qui les contient. Les valeurs initiales sont données par une émulsion identique mais conservée dans la glace et centrifugée à basse température de manière à éviter toute réaction.

Comme nous ne prenons que 1 g. de bacille pour 100 c. c. de liquide, les pertes dues à l'adsorption sur les corps bactériens sont faibles.

Il faudra cependant chercher à rendre minimum toutes les perturbations que nous venons de citer. Ce qui nous conduit à déterminer d'abord les conditions optima de l'oxydo-réduction. Nous étudierons successivement l'influence du pH, du nombre de lavages, de l'âge de la culture et des concentrations.

A. INFLUENCE DU pH SUR LA GLYCOLYSE DU BACILLE M. — L'acidité formée au cours de la glycolyse ralentit celle-ci, si l'on n'a pas soin de tamponner le milieu à la neutralité par l'addition de bicarbonate.

Pour 1 g. de bacilles (culture de vingt-deux heures sur moût de bière) lavés trois fois avec 20 c. c. ClK 0,9 p. 100, on ajoute 6,6 c. c. ClK, 1 c. c. acétylacétate de potassium 0,40 M/1, 1 c. c. de glucose 10 p. 100. A 9,6 c. c. de cette solution on ajoute, soit 1,4 c. c. ClK, soit 1,4 c. c. de bicarbonate de sodium 2,5 p. 100.

Sans bicarbonate.

MILLIGRAMMES

Glucose disparu par centimètre cube après incubation
de 5 h. 30 à 31° (atmosphère azote à 10 p. 100 CO₂). . . 1,4

Avec bicarbonate.

Glucose disparu par centimètre cube après 1 h. 30 d'in-
cubation à 31° (atmosphère azote 10 p. 100 CO₂). 2,96

Ces résultats nous ont amené à n'étudier la glycolyse qu'en milieu tamponné par le bicarbonate. Ce qui aura en plus l'avantage que nous pourrions en connaître l'activité par la méthode de Warburg. Toute formation d'acide est accompagnée d'un dégagement de gaz carbonique directement mesurable.

Dans l'expérience précédente, nous avons effectué cette mesure avec l'émulsion bicarbonatée en prenant des témoins. Tableau XII.

TABLEAU XII.

SUBSTRAT AJOUTÉ	CO ₂ dégagé en 1 h. 30 à 31° (N ₂ — 10 p. 100 CO ₂)
Sans substrat	e. c. 0,116
Glucose seul	0,135
Acétylacétate seul.	0,154
Glucose + acétylacétate	0,850

Dans un mémoire que nous avons signalé, Green avait trouvé que la β -hydroxybutyrique oxydase avait un maximum d'activité aux environs de pH 7. Ce que confirment les chiffres que nous venons de donner.

B. INFLUENCE DES LAVAGES. — Pour faire un bilan exact des transformations, il est nécessaire de laver les bactéries avec une solution isotonique. On élimine ainsi beaucoup de produits de déchet qui se sont accumulés sur les corps bactériens ainsi que le sucre provenant du milieu de culture. Les eaux de lavage précipitent

par l'alcool une gomme. D'autre part, il faut éviter pendant cette opération que les bacilles ne perdent de leur activité. On y réussit en les maintenant à une température inférieure à 15°. Les centrifugations doivent être faites à température la plus basse possible. On y réussit pendant les mois d'hiver en ne chauffant pas la salle de la centrifugeuse et en laissant le couvercle de cette dernière légèrement entr'ouvert pour créer une circulation d'air. Les émulsions ainsi préparées se conservent plusieurs heures à une température inférieure à 15° sans perdre beaucoup de leur activité. Mais nous nous sommes demandé si le nombre des lavages n'avait pas d'influence sur cette dernière. A cet effet, la récolte d'une culture de dix-huit heures sur moût de bière gélosé est soigneusement émulsionnée avec trois fois son poids de ClK 0,9 p. 100. Cette émulsion est divisée en quatre parties. Une partie est utilisée telle quelle, les autres seulement après 1, 2 ou 3 lavages avec quatre fois leur volume de solution isotonique. On a eu soin après ces opérations de ramener les émulsions exactement à leur volume initial.

Dans chaque cupule de Warburg, on met : 0,5 c. c. d'émulsion, 0,3 c. c. d'eau, 0,2 c. c. de bicarbonate de Na 5 p. 100 et : 0,1 c. c. acétylacétate 0,75 M plus 0,1 c. c. de glucose 20 p. 100 ou 0,2 c. c. d'eau si l'on opère sans substrat. L'atmosphère est d'azote à 10 p. 100 de CO₂.

On mesure le dégagement de CO₂ dû à l'acidité libérée. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XIII. Par cupule, il y a 0,125 g. de bacilles frais.

TABLEAU XIII.

	CO ₂ dégagé en 90' par cupule en présence de glucose et d'acétylacétate	CO ₂ dégagé en 90' sans substrat en c. c.
Emulsion initiale.	0,295	0,145
Emulsion après 1 lavage.	0,308	
Emulsion après 2 lavages	0,286	
Emulsion après 3 lavages	0,330	0,109

Les lavages ne font donc pas perdre d'activité aux bacilles. Par contre, l'acidité libérée sans substrat devient plus faible à mesure qu'augmente le nombre des lavages. Ce qui est compréhensible, car on fait disparaître ainsi les derniers glucides ou autres matières provenant du milieu de culture. Ceci nous montre aussi que point n'est besoin de laver les bacilles pour mesurer l'activité d'une culture.

C. INFLUENCE DE L'ÂGE DE LA CULTURE. — L'acidité libérée dépend de deux phénomènes distincts : l'autolyse et la glycolyse. Pour étudier cette dernière, il faut chercher à la rendre la plus forte possible par rapport à l'autolyse. Or, l'activité des bacilles dépend de leur âge. Nous allons donc suivre simultanément ces phénomènes.

Nous utilisons pour cela des boîtes de Petri. Nous y mettons de la gélose de manière à ce que son épaisseur soit la même que dans les boîtes de Nicole et nous les ensemençons avec un tampon de coton stérile que nous trempions dans une émulsion de bacilles. Nous nous efforçons de mettre sur chaque boîte la même quantité de bactéries.

Après séjour à l'étuve à 31°, nous mesurons le poids frais de la récolte et l'activité comme suit :

Pour 1 g. de bacilles, on ajoute 3 c. c. ClK 0,9 p. 100, 3 c. c. d'eau, 2 c. c. de bicarbonate de sodium 5 p. 100. Par cupule, on ajoute à 0,9 c. c. de cette solution soit 0,1 c. c. de glucose 10 p. 100 + 0,1 d'acétylacétate 0,751 M/2, soit 0,2 d'eau.

Nous mesurons le dégagement de CO₂ pendant les trente premières minutes, thermostat à 31° (tableau XIV).

TABLEAU XIV.

ÂGE de la culture	MASSE de la récolte par boîte de Petri de 9 cm de diamètre	POUR 0,1 GR. DE BACILLES FRAIS CO ₂ dégagé en 30 minutes	
		Avec substrat	Sans substrat
	g.	c. c.	c. c.
13 heures.	0,45	0,130	0,091
20 heures.	1	0,328	0,071
37 heures.	1,4	0,148	0,094
84 heures.	1,4	0,074	0,048

Nous répétons la même expérience en comparant la culture sur bouillon de haricots à la culture sur moût de bière (tableau XV).

On se rend compte immédiatement à la vue de ces résultats que la glycolyse du bacille M, dans les conditions où nous la mesurons, passe par un maximum qui coïncide à peu près avec le moment où la croissance a atteint aussi son maximum, alors que l'autolyse ne varie guère avec l'âge de la culture.

Si nous utilisons le moût de bière, nous aurons intérêt à prendre une culture de vingt-deux à vingt-quatre heures. Sur bouillon de haricots, il faudrait prendre une culture de seize heures. Nous avons examiné aussi le cas du bouillon de haricots saccharosé à 8 g. par litre au lieu de 20. Le maximum d'activité se produit alors avec une culture de vingt-trois heures. La récolte est aussi

TABLEAU XV.

AGE de la culture	MASSE de la récolte en gr.		POUR 0.1 GR. DE BAC. FRAIS : CO ₂ dégagé en 30'		
	moût de bière	bouillon de haricots	avec glucose + acétylacétate	sans substrat	
			moût de bière	bouillon de haricots	bouillon de haricots
			c. c.	c. c.	c. c.
14 heures.	0,73	1	0,200	0,265	0,076
16 h. 30.	0,87	1,1	0,273	0,255	0,076
20 heures.	1,1	1,15	0,239	0,224	0,072
23 heures.	1,25	1,25	0,309	0,231	0,072
25 h. 30.	1,3	1,25	0,322	0,237	0,070

relativement plus forte. La teneur en glucides du milieu de culture a donc une influence très nette.

Au cours des nombreuses expériences que nous avons effectuées, nous nous sommes aperçu que cette activité était excessivement variable, même si l'on avait soin d'opérer de la même manière. Les souches de départ ne sont jamais les mêmes et lesensemencements ne peuvent d'ailleurs être identiques. A côté de cela, la culture sur moût gélosé est quelque chose qui n'est pas très bien défini. Les bactéries de surface empêchent de respirer les bactéries au contact de la gélose. L'idéal serait d'obtenir des cultures en milieu liquide. On pourrait alors saisir la phase logarithmique de croissance pour laquelle, vraisemblablement, la glycolyse des bactéries doit être maximum. Nous aurions peut-être une fidélité plus grande dans nos résultats. Mais nous ne disposions pas d'une centrifugeuse de grande capacité, pouvant fonctionner à basse température, pour séparer les bactéries du milieu de culture.

Il est aussi probable que d'autres facteurs que nous ignorons interviennent dans ce phénomène et point n'est besoin de faire de plus longs développements pour s'apercevoir qu'il est inutile de rapporter les activités à des poids secs.

D. INFLUENCE DES CONCENTRATIONS EN GLUCOSE, EN ACIDE ACÉTYL-ACÉTIQUE ET EN BACILLES. — On vérifie aisément, comme il fallait s'y attendre, qu'aux environs des concentrations utilisées le glucose disparu et l'acidité formée pendant un temps déterminé sont proportionnels à la quantité de bacilles par centimètre cube, les autres concentrations restant égales d'ailleurs.

Si l'on fait varier la concentration en acétylacétate de 2,1 à 6,3 mg. d'acétone par centimètre cube, la quantité de CO₂ dégagée (hydrolyse non comprise) pendant un temps donné augmente de 30 p. 100 ; ceci sur une durée d'incubation de cinq heures. Pour la première heure, cette augmentation est seulement de 14 p. 100. Le résultat est compréhensible, plus la concentration en oxydant

augmente, plus la vitesse d'oxydation doit diminuer. Le glucose semble n'avoir d'influence que lorsque sa concentration dépasse 10 g. par centimètre cube. Il y a une diminution de dégagement de CO_2 (hydrolyse mise à part) de 24 p. 100 lorsque la concentration en glucose passe de 4,6 à 36 mg. par centimètre cube.

Pour conclure sur cette étude, nous dirons qu'il faut prendre comme concentrations en glucose et en acétylacétate celles qui nous permettent de mesurer avec la moindre erreur la disparition de ces corps, tout en ayant soin qu'il en reste toujours dans le milieu.

Nous prendrons comme concentration en glucose 10 mg. et en acide acétylacétique 7 à 10 mg. pour 1,1 c. c.

E. ETUDE QUANTITATIVE DE L'OXYDO-RÉDUCTION GLUCOSE-ACIDE ACÉTYLACÉTIQUE EN L'ABSENCE D'OXYGÈNE. — Maintenant que nous avons examiné l'action des divers facteurs, nous allons aborder l'étude quantitative de l'oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique.

A l'aide d'une raclette métallique, on récolte vingt-deux heures après l'ensemencement la culture des bacilles M, sur deux boîtes de Nicole (moût de bière). On en a obtenu 24 g., on place cette récolte dans un flacon avec des billes de verre, on ajoute 20 c. c. ClK 0,9 p. 100. On ferme le flacon avec un bouchon de caoutchouc, on agite le tout à l'aide de la machine à secousses pendant vingt minutes afin d'avoir une émulsion bien homogène. On répartit ensuite cette émulsion que l'on allonge de ClK 0,9 p. 100 dans des tubes à centrifuger de 35 c. c. chacun. On centrifuge trente minutes. On décante. On remplit à nouveau les tubes à centrifuger avec de la solution de ClK dans laquelle on réémulsionne les bacilles. On centrifuge encore une demi-heure et on décante à nouveau. Finalement on ajoute au culot de centrifugation de la solution de ClK, de manière à obtenir un volume égal à quatre fois le poids des bacilles, soit 96 c. c. On y ajoute $3 \times 24 = 72$ c. c. d'eau, 48 c. c. de bicarbonate de sodium 5 p. 100. On obtient ainsi l'émulsion E.

a) A 27 c. c. de E, on ajoute 6 c. c. d'eau, c'est l'émulsion E_A.

b) A 27 c. c. de E, on ajoute 3 c. c. de glucose 10 p. 100 et 3 c. c. d'eau, c'est l'émulsion E_B.

c) A 18 c. c. de E, on ajoute 2 c. c. d'eau et 2 c. c. acétylacétate de potassium 0,94 M/l, c'est l'émulsion E_C.

d) A 126 c. c. de E, on ajoute 14 c. c. de glucose 10 p. 100 et 14 c. c. acétylacétate de potassium 0,94 M/l, c'est l'émulsion E_D.

On place dans les cupules de Warburg 1 c. c. de chacune des émulsions afin de mesurer l'acidité libérée.

Une autre partie est conservée à 0°. Le reste incube dans des récipients agités constamment sous atmosphère d'azote à 10 p. 100 de CO_2 , tout comme les cupules, dans un thermostat à 31°. Après une incubation de cinq heures trois quarts, ces récipients sont

retirés du thermostat, refroidis à 0° et on centrifuge leur contenu à une température inférieure à 15°.

Dans les liquides privés de bacilles, on effectuera les dosages de glucose, d'acétylacétate, d'acides lactique, β -hydroxybutyrique et acétique par les méthodes décrites précédemment. Les résultats sont consignés dans le tableau XVI.

TABLEAU XVI.

PAR C. C. DE L'ÉMULSION INITIALE	E _A [°]	E _B	E _C	E _D
	mg.	mg.	mg.	mg.
Glucose ajouté		9		9
Acide acétylacétique ajouté			9	9
Bacilles frais	90	90	90	90
Bacilles secs (masse approximative)	10	10	10	10
Bicarbonate de Na ajouté	9,1	9,1	9,1	9,1
Après incubation de 5 h. 3/4 à 31° (N ₂ , 10 p. 100 CO ₂) par c. c. :				
Glucose disparu . . . { en mgr.		1,34	»	7,52
{ 10 ⁻⁶ Mol.		7,46	»	41,8
Acide acétylacétique { en mgr.			1,5	4,76
disparu { 10 ⁻⁶ Mol.			14,7	46,6
Acide lactique formé. { en mgr.	0,113	0,87	0,051	4,77
{ 10 ⁻⁶ Mol.	1,25	9,67	0,56	53
Acide β -hydroxybuty- { en mgr.	0,493			4,85
rique formé { 10 ⁻⁶ Mol.	4,74			46,7
Acide acétique formé. { en mgr.				1
{ 10 ⁻⁶ Mol.				16,7
Acidité libérée. . . . { en mgr.	0,44	0,51	0,48	2,93
{ 10 ⁻⁶ Mol.	19,6	22,7	21,4	131

L'acidité libérée au cours de l'incubation se lit sur les courbes de la figure 4.

Cette expérience a été reproduite plusieurs fois avec les mêmes proportions de réactifs. Dans le tableau XVII nous donnons les résultats obtenus pour l'acidité dégagée, le glucose et l'acide acétylacétique disparu. Dans la colonne observations, nous avons noté par quels points de détails les expériences diffèrent entre elles.

D'après ces tableaux et cette figure, nous voyons donc qu'avec le bacille M en aérobiose :

1° Il faut la présence simultanée de glucose et d'acétylacétate pour observer une augmentation de l'acidité libérée.

2° Dans ce cas, il disparaît cinq fois plus de glucose et d'acétylacétate que lorsque ces deux substrats sont seuls.

3° En première approximation, il disparaît simultanément 1 molécule d'acétylacétate et 1 molécule de glucose quand il apparaît 1 molécule d'acide β -hydroxybutyrique, 1 molécule d'acide

TABLEAU XVII. — Les chiffres sont rapportés à 1 cent. cube d'émulsion.

NUMÉRO DE L'EXPÉRIENCE	DURÉE D'INCUBATION A 34° en heures	E _A				E _B				E _C				E _D				OBSERVATIONS		
		Acidité libérée		Acidité libérée		Glucose disparu		Acidité libérée		Acidité libérée		Glucose disparu		Acidité libérée		Glucose disparu			Acide acétyl acétique disparu	
		En centimètre cube	10 ⁻⁶ molécules	En centimètre cube	10 ⁻⁶ molécules	En milligramme	10 ⁻⁶ molécules	En centimètre cube	10 ⁻⁶ molécules	En centimètre cube	10 ⁻⁶ molécules	En milligramme	10 ⁻⁶ molécules	En centimètre cube	10 ⁻⁶ molécules	En milligramme	10 ⁻⁶ molécules		En milligramme	10 ⁻⁶ molécules
1	1,30	0,432	5,9	0,451	6,7			0,476	7,8			0,965	43	2,96	16,4	2,44	23,8	0	c.c. 075 bicarbonate 5 p. 100 pour 4 c.c. 4 (culture sur mout de bière).	
2	5	0,270	12	0,324	14,5	4	5,57	0,325	14,5	0,45	4,4	2,17	97	5,7	31,4	3,54	34,7		Concentration en glucose, 18 milligr. par cent. cube (culture sur mout de bière).	
3	10	0,456	7	0,575	25,6	0,83	4,6	0,480	8	0,33	3,23	1,35	60,3	3,07	17,1	1,72	16,8	0	gr. 040 bacilles frais par cent. cube (culture sur bouillon de haricots).	
4	5,45	0,44	19,6	0,51	22,7	1,34	7,1	0,48	21,4	1,5	14,7	2,93	131	7,52	41,8	4,76	46,6		(Culture sur mout de bière).	

lactique, 0,4 molécule d'acide acétique. Il y a libération de 2,4 molécules d'acide.

Mais ceci nous conduit à faire les remarques suivantes :

a) L'autolyse peut être un phénomène constant et se reproduire dans les émulsions E_A , E_B , E_C et E_D (voir p. 62). Par contre, le glucose ou l'acétylacétate seuls doivent être métabolisés aux dépens des réserves intracellulaires alors que celles-ci restent intactes dans l'émulsion E_O . C'est ce que tendraient à montrer

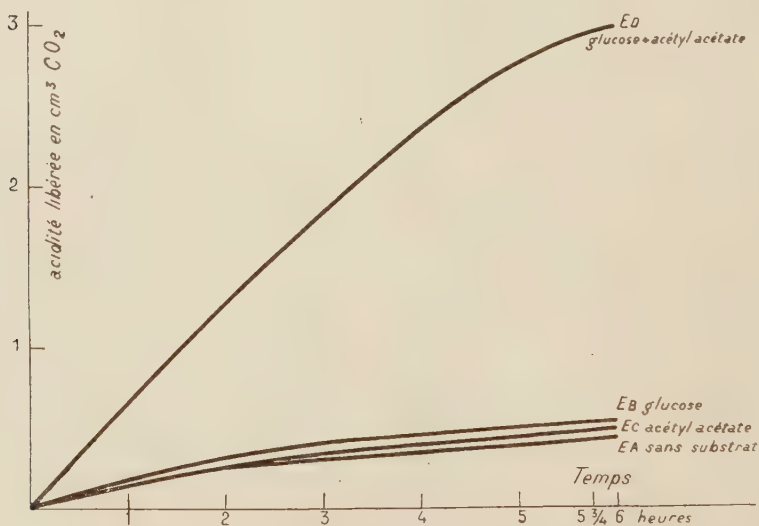


FIG. 4.

les mesures de diminution du poids sec des bactéries contenues dans 1 c. c. d'émulsion (tableau XVIII).

On peut aussi penser que la diminution de masse de E_D due à l'action du glucose seul ou de l'acétylacétate seul, comme dans E_B et E_C , est compensée par une nouvelle formation de réserves ou une autolyse moins avancée.

b) On ne retrouve, en admettant qu'il se dégage 1 CO₂ par molécule d'acide acétique formé, que 34,8 μ Mol de glucose sous la forme d'acides acétique et lactique alors qu'on en compte 41,8 de disparu. La différence est de 7 Mol, soit 17 p. 100. Les quantités mises en jeu sont encore du même ordre de grandeur que le poids sec de bacilles.

c) L'acidité libérée sans substrat ne correspond que pour une faible part à l'acide β -hydroxybutyrique durant ces premières heures d'autolyse, soit 24 p. 100, tandis que l'on sait d'après les résultats de Lemoigne que cet acide est presque le seul à se former si l'autolyse se poursuit pendant plusieurs jours.

TABLEAU XVIII.

EXPÉRIENCE N° 3	DIMINUTION du poids sec des bacilles contenus dans 1 cent. cube en milligramme	POIDS SEC DES BACILLES dans 1 cent. cube en milligrammes	
		Avant incubation	Après incubation
E _A	0,32	4,26	3,94
E _B	0,46	4,55	4,09
E _C	0,56	4,58	4,02
E _D	0,34	4,76	4,42

En présence de glucose et d'acétylacétate, si l'on met à part l'acidité libérée par autolyse supposée la même que sans substrat, il reste 112,4 Mol ; l'acide lactique + l'acide acétique + CO₂ correspondent à 86,4 μ M. Il reste une différence de 26 μ Mol, soit 23 p. 100.

Si l'on suppose que cette acidité est due au glucose que nous ne retrouvons pas, il faut supposer qu'à une molécule de ce glucose correspondent 3,7 fonctions acide. D'après les analyses de E_B, l'acide lactique formé doit l'être aux dépens de l'acidité libérée par autolyse.

d) Du point de vue du bilan des hydrogènes, la formation d'acide acétique supposé produit à partir de l'acide lactique correspond à la réduction de 33,4 μ Mol d'acétylate. On ne voit pas encore à quoi est due la réduction du reste d'acétylacétate. Il est possible qu'il se forme un acide inconnu que nous n'avons pas encore identifié.

Toute cette discussion nous fait entrevoir la complexité d'un problème qu'il serait osé de vouloir résoudre du premier coup jusque dans ses moindres détails. Retenons seulement ces deux points essentiels :

1° L'acidité libérée par le bacille M ne peut être accrue que par la présence simultanée de glucose et d'acétylacétate.

2° L'oxydo-réduction glucose-acétylacétate produit de l'acide lactique.

Etude quantitative du métabolisme du glucose par le bacille M en présence d'oxygène.

Dans l'oxydo-réduction que nous venons d'étudier, l'acétylacétate est un accepteur d'hydrogène et joue en l'absence d'air le rôle de l'oxygène. Nous avons vérifié qu'il était à peine réduit en aérobiose. Mais il est indispensable maintenant de comparer le métabolisme du glucose en présence d'acétylacétate et en présence d'oxygène.

A cet effet, la récolte de deux boîtes de Nicole (culture sur moût de bière) est émulsionnée avec des billes de verre, lavée deux fois avec 110 c. c. ClK 0,9 p. 100 et réémulsionnée avec ClK, de façon qu'à 1 g. de bacilles frais correspondent 4 c. c. auxquels on ajoute 4 c. c. d'eau, 2 c. c. de bicarbonate de sodium 5 p. 100, 1 c. c. glucose 11 p. 100. On a l'émulsion E_B.

On place dans chacune des 3 cupules de Warburg 1 c. c. d'émulsion. La première, avec une atmosphère d'azote à 10 p. 100 CO₂. La deuxième avec une atmosphère d'oxygène à

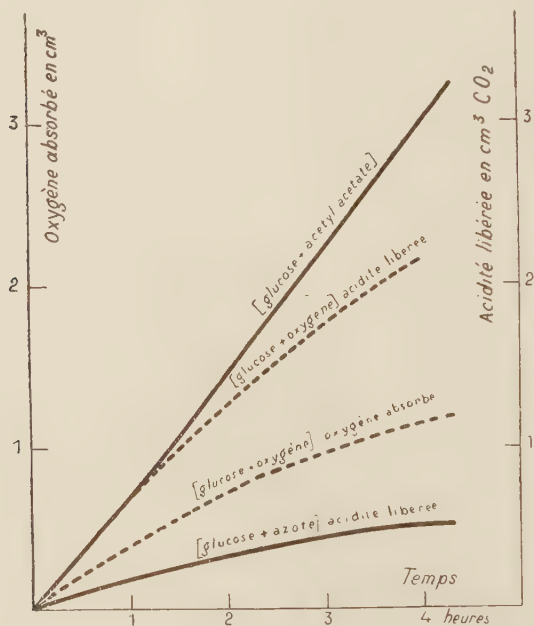


FIG. 5.

10 p. 100 CO₂. La troisième avec une atmosphère d'oxygène, on a mis 0,4 c. c. de soude normale dans les diverticules.

Le premier manomètre nous donne l'acidité libérée en anaérobiose. Le troisième nous donne l'oxygène absorbé en aérobie. Le deuxième nous donne l'acidité libérée, moins l'oxygène absorbé. Une quatrième cupule contient 1 c. c. d'émulsion mais où $\frac{0,1}{1,1}$ c. c. d'eau est remplacé par $\frac{0,1}{1,1}$ c. c. d'acétylacétate 0,910 M. C'est l'émulsion E_B.

Le reste de l'émulsion E_B est réparti en trois portions.

Une première est conservée à 0° ; une deuxième est mise dans une fiole d'Erlenmeyer sous atmosphère d'azote à 10 p. 100 de CO₂;

une troisième dans une autre fiole sous atmosphère d'oxygène à 10 p. 100 de CO_2 . On agite constamment ces récipients qui plongent dans le thermostat à 31° . On les y laisse ainsi quatre heures, après quoi, on les refroidit à 0° et on centrifuge leur contenu.

Nous avons reproduit (fig. 5) les courbes de libération d'acidité et d'absorption d'oxygène par centimètre cube d'émulsion.

Dans le tableau XIX, nous indiquons les valeurs trouvées à la suite des dosages que nous avons effectués.

TABLEAU XIX.

1 C. C. DE L'ÉMULSION INITIALE CONTIENT :	E_B atmosphère d'azote	E_B atmosphère d'oxygène	E_D
	mg.	mg.	mg.
Glucose ajouté par centimètre cube. . . .	9,9	9,9	9,9
Acide acétylacétique ajouté			9
Bacilles frais	90	90	90
Bacilles secs (masse approximative)	10	10	10
Bicarbonate de sodium.	9,1	9,1	9,1
Après incubation 4 heures à $31^\circ 5$ par c. c. :			
Glucose disparu { en milligr. . .	1	9,6	
en 10^{-6} mol.	5,56	53,3	
Acide lactique formé. . . { en milligr. . .	0,22	2,41	
en 10^{-6} mol.	2,45	26,8	
Acide β -hydroxybutyrique { en milligr. . .		0,393	
formé { en 10^{-6} mol.		3,78	
Acide acétique formé . . { en milligr. . .		1,17	
en 10^{-6} mol.		19,5	
Acidité libérée { en c. c. CO_2 . .	0,50	2,15	3,01
en 10^{-6} mol.	22,2	96	134
Oxygène absorbé { en milligr. . .		1,13	
en 10^{-6} mol.		50	

A l'examen de ces résultats nous voyons :

1° Comme l'acétylacétate en présence de glucose, l'oxygène permet une forte libération d'acides.

L'acidité libérée est la même en présence d'oxygène ou en présence d'acétylacétate, du moins au début lorsque les concentrations en glucose sont identiques dans les deux cas.

2° En première approximation, 1 molécule d'oxygène fait disparaître 1 molécule de glucose. Or une molécule d'oxygène a un pouvoir oxydant double de celui d'une molécule d'acétylacétate.

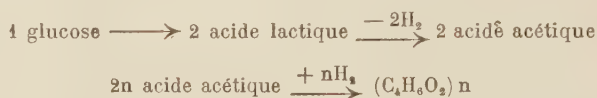
3° Il n'y a que $1/2$ molécule d'acide lactique formé pour une molécule de glucose disparu et il ne se forme pas directement d'acide β -hydroxybutyrique si ce n'est celui qui peut être libéré par autolyse normale. L'acidité formée par molécule de

glucose disparu passe de 2,6 dans le cas de l'acétylacétate à 1,4 dans le cas de l'oxygène.

Comme précédemment, nous serons amenés aux remarques suivantes :

a) On ne retrouve que 44 p. 100 du glucose disparu mais 89 p. 100 de l'acidité libérée sous forme d'acide lactique et d'acide acétique en admettant toujours que la formation d'une molécule de ce dernier libère une molécule de CO_2 . Nous en sommes conduit à penser qu'une grande partie du glucose a dû être transformée en matières de réserve.

b) Il nous est impossible de trouver l'utilisation des molécules d'oxygène absorbé, attendu que la moitié du glucose nous a échappé. Nous pourrions peut-être supposer les réactions



Mais cela ne nous donnerait guère plus de renseignements sur le mécanisme de la glycolyse.

c) Il s'est formé en présence d'oxygène et de glucose de l'acide acétylacétique mais la proportion est très faible (voir p. 55). Nous retiendrons donc comme points essentiels de cette discussion et des expériences :

1° L'acidité libérée ne dépend pas de l'accepteur d'hydrogène, que ce soit l'acétylacétate ou l'oxygène.

2° La molécule de glucose perd deux fois plus d'hydrogène en présence d'oxygène qu'en présence d'acétylacétate.

Formation d'acide acétylacétique par le bacille M.

Nous avons relaté (p. 25) que le bacille M produisait de l'acide acétylacétique, nous allons aborder une étude quantitative de ce phénomène.

1° L'acide acétylacétique peut se former aux dépens du glucose ou même aux dépens des réserves des bacilles (112 bis), comme le prouve l'expérience suivante : les dosages d'acide acétylacétique ont été faits suivant la méthode indiquée (p. 31).

1 g. de bacilles sont lavés trois fois avec 40 c. c. ClK 0,9 p. 100, on les émulsionne avec 8 c. c. KCl et 0,5 c. c. de tampon de phosphate 0,45 M de pH 6,85, c'est l'émulsion E avec laquelle nous avons les résultats (tableau XX) :

(112 bis) Cela n'a d'ailleurs rien d'étonnant car les bacilles libèrent de l'acide β -hydroxybutyrique qui, par oxydation, peut fort bien se transformer en acide cétonique.

TABLEAU XX.

	ACIDE ACÉTYLACÉTIQUE formé par cent. cube d'émulsion (milligrammes)
5 cent. cubes E + 0,2 glucose 20 p. 100 : incubation 4 h. à 31° sous atmosphère d'oxygène.	0,112
5 cent. cubes E + 0,2 cent. cubes eau : incubation 4 h. à 31° sous atmosphère d'oxygène . .	0,044

On trouve d'ailleurs des traces d'acide acétylacétique décelables par la réaction de Simon Hopkins dans les corps bactériens eux-mêmes après destruction de ces derniers, soit par une ébullition très rapide, soit par l'acide trichloracétique.

2° Dans une autre expérience, nous avons étudié comment s'accumulait cet acide en présence de glucose :

10 g. de bacilles sont lavés trois fois avec 150 c. c. de ClK 0,9 p. 100. On les émulsionne avec 60 c. c. de ClK, 3,5 c. c. phosphate, 0,45 M et 8 c. c. glucose 20 p. 100.

On laisse incuber cette émulsion sous atmosphère d'oxygène à 31°. Les récipients sont soumis à une agitation continue.

On effectue des prélèvements et on dose l'acide acétylacétique après élimination des bacilles par centrifugation, d'où le tableau XXI et la courbe (fig. 5).

TABLEAU XXI.

DURÉE DE L'INCUBATION en heures	ACIDE ACÉTYLACÉTIQUE formé en milligrammes par cent. cube	GLUCOSE DISPARU en milligrammes par cent. cube
0	0	
2	0,011	
4	0,099	
6	0,234	
8	0,278	8,3

Au cours de la glycolyse, le milieu s'acidifie jusqu'à pH 4,5 ; on a vérifié qu'avec une faible quantité de glucose, la teneur en acide acétylacétique qui augmente au début redécroit dès que le glucose a disparu.

En résumé, la quantité d'acide acétylacétique formé est faible par rapport au glucose disparu. Si cet acide était un produit principal ou un intermédiaire de la glycolyse, il devrait ou s'accumuler dans le milieu dans de fortes proportions ou se retrouver réduit d'après ce que nous avons vu dans l'oxydo-réduction

glucose-acide acétylacétique. Or, on ne retrouve (p. 53) que de faibles quantités d'acide β -hydroxybutyrique. Il se forme peut-être du corps Y, mais celui-ci s'hydrolyse par une simple action diastasique, la formation de ce dernier à partir de l'acide β hydroxybutyrique ne peut alors se faire sans apport d'énergie

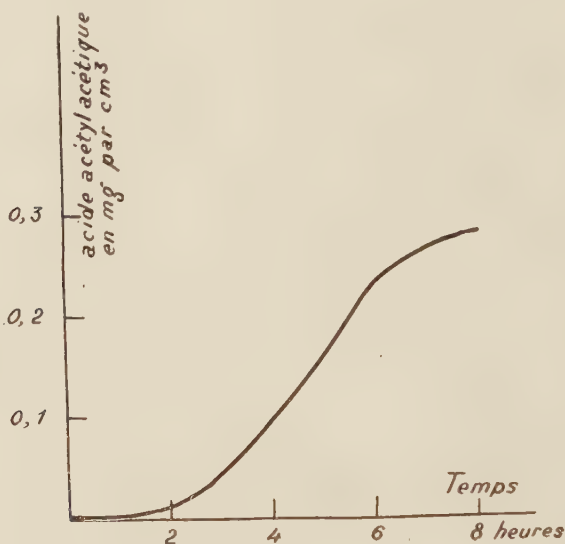


FIG. 6.

extérieure. Nous pensons que l'acide acétylacétique doit plutôt être considéré comme un produit anormal de la glycolyse.

Métabolisme du lactate, de l'acétate, du succinate et de l'arabinose. Action de certains inhibiteurs.

Nous venons de voir que l'acide acétylacétique doit être considéré comme un produit secondaire de la fermentation β -hydroxybutyrique, il n'en est pas de même des acides lactique et acétique que l'on retrouve en fortes proportions par rapport au glucose disparu. En présence de bicarbonate, ils sont en quelque sorte les produits finaux de la glycolyse. Il y a à cela deux raisons : le fait de maintenir un pH à une valeur donnée revient à accélérer des réactions et à en ralentir d'autres. L'acétylacétate, seul accepteur d'hydrogène, n'a pas un pouvoir oxydant suffisant pour oxyder le lactate. La glycolyse doit donc s'arrêter à la formation d'acide lactique. Les expériences précédentes montrent qu'il s'accumulait beaucoup plus de cet acide quand le glucose était oxydé par

l'acide acétylacétique que par l'oxygène ; nous avons vérifié qu'avec le bacille M le lactate ne disparaissait pas en présence d'acétylacétate et que ce dernier était transformé, aux erreurs d'expérience près, dans les mêmes proportions que sans lactate.

Avec l'acétate, comme nous ne connaissons pas son mode d'oxydation et encore moins le potentiel d'oxydo-réduction correspondant, nous n'aurons que l'expérience pour nous guider. En présence d'acétylacétate et d'acétate, le bacille M ne développe pas plus d'acidité que sans substrat et les dosages d'acétone totale ne nous permettent pas de conclure d'une façon catégorique sur un accroissement du métabolisme de l'acétylacétate.

Nous avons aussi essayé le succinate car nous avions pensé que, d'après les théories de Szent-Gyorgi (113), les hydrogènes pourraient passer sur le système acide fumarique — acide succinique. Mais si nous enregistrons un très faible accroissement de la disparition de l'acétylacétate, le malonate de sodium à la concentration de 1 p. 1.000, n'y a dessus aucun effet.

Citons encore que des pentoses ne peuvent remplacer le glucose, nous avons trouvé que l'arabinose était sans action.

Il ne nous paraît pas important de poursuivre de telles investigations. En effet, ces recherches porteraient sur un métabolisme presque nul et les variations de concentration seraient souvent dans la limite des erreurs d'expérience.

Par contre, les inhibiteurs présentent plus d'intérêt. Nous avons vu dans le premier chapitre que l'utilisation de ces derniers avait bien souvent donné des résultats féconds.

Pour savoir où diriger nos recherches futures, nous avons examiné rapidement ce que peuvent faire le fluorure, le toluène, le rouge congo.

Le fluorure, qui dans la fermentation alcoolique inhibe spécifiquement la transformation d'acide phosphoglycérique en acide phosphopyruvique (114), a dans l'oxydo-réduction glucose-acétylacétate, sur l'acidité libérée, un pouvoir inhibiteur marqué. Nous avons utilisé le fluorure de sodium à la concentration finale de 2 p. 1.000.

Le toluène, qui permet avec la levure l'accumulation de l'hexose diphosphate, inhibe toute la glycolyse par le bacille M en présence d'acétylacétate. Nous l'avons utilisé sans résultats dans la recherche d'une glycolyse phosphorylante. Il nous paraît être un poison total.

Les travaux de Quastel (115) ont montré que le rouge congo était un inhibiteur spécifique de la fumarase qui permet l'équilibre acide malique $\rightleftharpoons$ acide fumarique que l'on retrouve dans

(113) *Loc. cit.*, n° 23.

(114) LOHMANN et MEYERHOF, *Bioch. Z.*, 1934, **273**, 60.

(115) QUASTEL, *Bioch. J.*, 1931, **25**, 898.

le cycle de l'acide citrique de Krebs et dans les théories de Szent-Gyorgi. Avec le bacille M nous avons trouvé que le rouge congo à la concentration de $M/2 \cdot 10^{-4}$ diminuait notre oxydo-réduction seulement de 12 p. 100 alors qu'à cette concentration la fumarase n'agit plus.

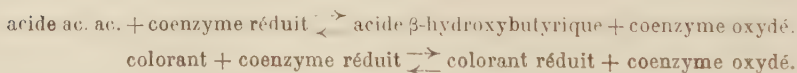
C'est une deuxième raison pour éliminer des réactions possibles dans la glycolyse du bacille M, le cycle de l'acide citrique.

Considérations physico-chimiques.

Nous nous proposons d'étudier maintenant l'oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique, du point de vue physico-chimique. Nous analyserons ici les mémoires de Wurmser et de Boe (116), Wurmser et Mayer (117), Barron et Hastings (118), Green, Dewan et Leloir (119) et nous verrons les conséquences que nous pourrions en tirer.

Le passage de l'acide acétylacétique à l'acide β -hydroxybutyrique nécessite théoriquement la présence d'hydrogène sous une certaine tension. Pour faire apparaître cette tension et la rendre mesurable, il faudra premièrement la présence de la diastase spécifique qui permet à l'oxydant ou au réducteur d'agir sur ces composés, mais cette diastase n'agit pas sur l'électrode de platine parce que c'est un colloïde. Il faut alors ajouter au milieu un corps oxydo-réducteur capable d'impressionner l'électrode, c'est-à-dire un corps électro-actif; celui-ci devra être au voisinage de son virage pour que son potentiel d'électrode soit défini et par conséquent facilement et fidèlement mesurable. Dans le cas de l'acide β -hydroxybutyrique, on prend le benzylviologène et dans le cas de l'oxydo-réduction acide pyruvique-acide lactique, on prend le mélange de pyocyanine et de violet de crésyl.

Nous aurons alors les équilibres suivants que nous écrirons dans le cas de l'acide acétylacétique



C'est le colorant qui sera capable d'échanger des électrons avec l'électrode car il se dissocie :



(116) WURMSER et DE BOE, *C. R.*, 1932, **194**, 2139.

(117) WURMSER et MAYER, *C. R.*, 1932, **195**, 81.

(118) BARRON et HASTINGS, *J. Biol. Chem.*, 1934, **107**, 567.

(119) *Loc. cit.*, n° 12.

Le potentiel mesuré dépend uniquement du pH et des proportions d'acide acétylacétique et d'acide β -hydroxybutyrique. Les quantités d'enzyme et de colorant n'interviennent pas, ils sont tous les deux en équilibre avec leur forme réduite et en quantités trop faibles par rapport aux corps cétoniques pour pouvoir imposer leur potentiel. Celui-ci sera de la forme :

$$E_h = E_o - \frac{RT}{2F} L_n \frac{\text{acide } \beta\text{-hydroxybutyrique}}{\text{acide acétylacétique}}.$$

La vérification de cette formule, à un pH donné, prouvera la réversibilité de la réaction.

Si l'on tient compte du pH et de la dissociation des acides, nous aurons la relation suivante due à Clark et Borsook

$$E_h = E_o - \frac{RT}{2F} L_n \frac{\text{acide } \beta\text{-hydroxybutyrique total}}{\text{acide acétylacétique total}} - \frac{RT}{F} L_n \frac{1}{[H^+]} + \frac{RT}{F} L \frac{K_o K_r + [H^+]}{K_r K_o + [H^+]}$$

dans laquelle :

R est la constante des gaz parfaits

T, la température absolue

F, le Faraday

H^+ est la concentration des ions H^+

K_o , la constante de dissociation de l'acide oxydé,

soit $2,6 \cdot 10^{-4}$ pour l'acide acétylacétique

soit $3,2 \cdot 10^{-3}$ pour l'acide pyruvique

K_r , la constante de dissociation de l'acide réduit

soit $3,9 \cdot 10^{-5}$ pour l'acide β -hydroxybutyrique

et $1,55 \cdot 10^{-4}$ pour l'acide lactique.

Au voisinage de la neutralité où nous opérons, la valeur du dernier terme est négligeable.

E_o caractérise le pouvoir oxydo-réducteur des systèmes étudiés.

A 38° , $E_o = +0,150$ volts pour le système β -hydroxybutyrique acide acétyl acétique

$E_o = +0,248$ volts pour le système acide lactique acide pyruvique.

D'après les travaux cités, nous avons dessiné sur la figure 7 les courbes donnant pour ces deux équilibres E_h en fonction du pourcentage de corps réduit à pH 7 et à 37° . Nous y avons ajouté celles relatives à l'équilibre cozymase-cozymase hydrogénée et celles relatives à l'équilibre acide fumarique-acide succinique d'après les données de Green et Dewan (120) et de Wurmser (121).

(120) GREEN et DEWAN, *Bioch. J.*, 1937, **31**, 1069.

(121) WURMSER, *Oxydations et réductions* 281.

Nous voyons donc que l'acide β -hydroxybutyrique est un réducteur plus énergique que l'acide lactique. L'acide acétylacétique, qui peut oxyder le glucose, ne pourra pas oxyder l'acide lactique en acide pyruvique et on comprend ainsi pourquoi cet acide s'accu-

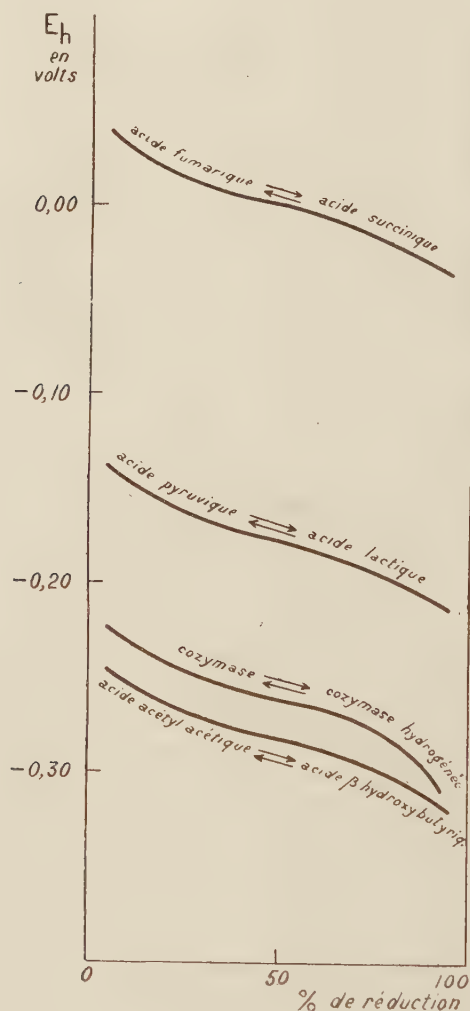


FIG. 7.

mule dans nos expériences, particulièrement en l'absence d'oxygène. Nous avons vérifié que l'acide lactique ne disparaît pas lorsque le bacille M n'a comme oxydant que l'acide acétylacétique alors qu'en présence d'oxygène ce bacille transforme l'acide lac-

tique en acide pyruvique décelable par la réaction de Simon. Green a montré que la cozymase était le coferment de la β -hydroxybutyrique oxydase. Nous comprenons donc pourquoi celle-ci se trouve en si grandes quantités dans le bacille M (voir p. 15).

Dans l'oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique, c'est donc vraisemblablement la cozymase réduite par le glucose qui hydrogène l'acide acétylacétique. Mais nous ne pouvons rien dire sur le mécanisme de la réduction de la cozymase.

Néanmoins, ces considérations physico-chimiques nous aident à comprendre le mécanisme de l'accumulation de l'acide lactique et nous montrent l'impossibilité théorique de certaines réactions.

Discussion et conclusions du deuxième chapitre.

Après le travail d'analyse qualitative qui constitue le premier chapitre, il nous fallait démontrer par des chiffres l'existence de l'oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique avec production concomitante d'acide lactique. C'est l'objet de ce deuxième chapitre qui nous donne, en plus, d'autres renseignements sur le mécanisme de la glycolyse.

I. La recherche des conditions optima de l'oxydo-réduction fait apparaître la fragilité du système enzymatique du bacille M : il faut prendre une culture d'un âge déterminé et opérer à un pH voisin de la neutralité. La levure est, de loin, beaucoup plus résistante, c'est une raison de plus pour nous faire rejeter la possibilité d'une glycolyse phosphorylante en tous points identique chez ces deux organismes.

Il est normal de supposer que la cozymase est le coferment de la réductase de l'acide acétylacétique. Le transport d'hydrogène se fait par son intermédiaire, du glucose sur l'acide acétylacétique. Mais si dans la fermentation alcoolique la cozymase est hydrogénée par l'aldéhyde phosphoglycérique, rien ne nous permet d'affirmer qu'il en est de même ici. Lors de la formation d'alcool, cette oxydo-réduction est seule à libérer une acidité qui d'abord fixe se transforme en acidité volatile par la décarboxylation de l'acide pyruvique.

La cozymase oxyde le glucose et c'est un produit d'oxydation de ce dernier qui, après transformation, est réduit par la cozymase hydrogénée, le cycle est fermé sur lui-même tandis qu'avec le bacille M il faut pour qu'il y ait libération d'acidité, la présence simultanée d'un réducteur, le glucose, et d'un oxydant, l'acide acétylacétique. L'un de ces corps seuls ne libère pas plus d'acidité que sans substrat.

Or, en admettant qu'il y ait 1 molécule d'acide libérée lorsque la cozymase est réduite pour hydrogéner ensuite l'acide acétylacétique, nous sommes encore loin de l'expérience et il faut

penser soit que la cozymase elle-même préside à d'autres oxydo-réductions, soit qu'une diastase différente agit de la même façon.

Il est assez remarquable de constater que l'acidité libérée par unité de temps est la même avec l'oxygène ou l'acide acétylacétique ; il est donc à supposer que c'est la vitesse d'oxydation du glucose qui est la plus lente de toutes et que c'est elle qui détermine la rapidité de la glycolyse, mais dans ce cas on ne comprend pas encore pourquoi il y a moins d'acidité libérée par molécule de glucose disparue en présence d'oxygène qu'en présence d'acétylacétate.

La cozymase oxyde spécifiquement l'acide β -hydroxybutyrique gauche ; comme Friedmann, avec la levure, obtient de l'acide droit, le mécanisme qu'il a étudié est lié à un autre enzyme.

II. A côté de la glycolyse, il y a l'autolyse qui est un phénomène bien spécial, on ne retrouve dans les premières heures d'incubation que 25 p. 100 de l'acidité libérée sous forme d'acide β -hydroxybutyrique alors que l'on sait que si celle-ci se poursuit plusieurs jours, cette proportion atteint 70 p. 100. La courbe d'acidité formée sans substrat a d'abord une pente assez forte qui diminue ensuite pour atteindre une valeur constante à partir de la deuxième heure.

Après une heure ou deux d'autolyse les bacilles ont perdu leurs propriétés oxydo-réductrices. Il y a donc, dans cette période, destruction du système enzymatique et une partie de l'acidité libérée doit être due à ce phénomène. On conçoit très bien que dans cette opération, il y ait mise en liberté d'acide phosphorique par la déphosphorylation des coenzymes qui sont ainsi inactivés.

En présence de glucose seul, cette autolyse entraîne une partie du sucre, et une partie de l'acidité libérée se retrouve sous forme d'acide lactique au lieu de se retrouver sous une autre forme. Mais tout ce mécanisme est encore très obscur.

En présence de glucose et d'acide acétylacétique, le système enzymatique fonctionne et ne se désintègre pas de la même manière que sans substrat. Faire un bilan de l'oxydo-réduction devient donc difficile car nous ne connaissons pas en particulier l'acidité due au phénomène d'autolyse, et pour interpréter les chiffres obtenus et formuler les réactions qui se produisent on pourra se contenter d'une vérification assez grossière, sachant bien qu'il est impossible d'avoir mieux à cause de la superposition de nombreux autres phénomènes.

Ces restrictions étant faites, nous dirons qu'il disparaît 1 molécule de glucose pour 1 molécule d'acide acétylacétique ou 1 molécule d'oxygène.

La glycolyse du bacille M comprend une partie qui peut se produire avec un oxydant faible comme l'acide acétylacétique et une autre partie pour laquelle il faut un oxydant plus énergique : l'oxygène. Cette deuxième partie comprend l'oxydation de l'acide

lactique qui ne peut se produire avec l'acétylacétate dont le pouvoir oxydant est inférieur à celui de l'acide pyruvique qui doit se former.

L'acide acétique qui se produit dans la première partie ne peut l'être à partir de l'acide lactique. Il pourrait néanmoins se former à partir de l'acide pyruvique que le bacille M produit par oxydation du lactate en présence d'air.

L'acide lactique et l'acide acétique sont donc des étapes de la fermentation β -hydroxybutyrique et le cycle de l'acide citrique est à écarter.

Sur le devenir de l'acide acétique nous ne pourrions faire que des hypothèses. La polymérisation de ce dernier ou la formation d'acide acétopyruvique, comme le suppose Krebs, ne suffit pas à expliquer les phénomènes, puisque l'acide acétylacétique qui en résulterait n'est pas un composé intermédiaire.

L'hexosemonophosphate se polymérise en glycogène et libère de l'acide phosphorique (122), mais on ne peut pas synthétiser directement le glycogène à partir du glucose, c'est théoriquement impossible. Par analogie, on peut penser qu'il en est de même ici et que l'acide β -hydroxybutyrique se produit à l'état d'un composé phosphorylé qui par polymérisation donnera le corps Y. L'acide acétylacétique proviendrait de l'hydrolyse anormale de l'ester phosphorique correspondant qui, lui, serait un intermédiaire normal de la glycolyse.

Et ceci nous ferait comprendre l'acidose chez les diabétiques. Tout comme avec le bacille M, l'acide acétylacétique serait un produit accidentel de l'organisme humain, mais si celui-ci s'y forme, il entre en oxydo-réduction avec le glucose et produit ainsi, à côté de l'oxygène, une acidité qui est surtout fixe et ne peut être éliminée par les organes respiratoires.

(122) *Loc. cit.*, n° 18.

CONCLUSIONS

La formation d'acide β -hydroxybutyrique par le bacille M fait l'objet de ce travail.

Nous avons voulu apporter une contribution à la découverte de Lemoigne en nous bornant à l'étude du mécanisme de la glycolyse par ce bacille, sur lequel, hormis les produits finaux, nous ne possédions aucun renseignement.

Après avoir obtenu des résultats négatifs dans la recherche d'une glycolyse phosphorylante, nous avons trouvé qu'en présence d'acide acétylacétique le glucose était métabolisé par le bacille M. Cette oxydo-réduction, particulièrement intense lorsque le milieu est tamponné par le bicarbonate, est accompagnée de la formation d'acide β -hydroxybutyrique gauche, d'acide lactique et d'acide acétique, corps dont nous avons démontré la présence.

L'acide acétylacétique lui-même peut être produit en petites quantités par le bacille M à partir du glucose, mais il doit être considéré comme un produit anormal de la glycolyse.

Ces phénomènes ont été soumis à une étude quantitative, ce qui nous a amené à mettre au point le dosage d'acide lactique en présence d'acide β -hydroxybutyrique, et réciproquement. Nous avons montré que l'aldéhyde pouvait être détruit spécifiquement à côté de l'acétone par le réactif de Tollens et nous en avons déduit une technique de dosage d'acétone en présence d'aldéhyde.

Nous avons aussi montré que la réaction de Legal pouvait servir au dosage de l'acide acétylacétique et que cette méthode convenait particulièrement bien pour des mesures comparatives à faire en série.

À l'aide de ces techniques, toutes vérifiées minutieusement, nous avons entrepris l'étude quantitative de l'oxydo-réduction glucose-acide acétylacétique avec des bacilles lavés. Après une recherche des conditions optima, nous avons comparé le rôle de cet acide à celui de l'oxygène qui pousse plus loin la transformation du glucose.

L'action de quelques inhibiteurs a été envisagée.

Il ressort de toutes ces considérations que pour avoir une libération d'acide avec le bacille M, autre que celle produite par autolyse, il faut la présence simultanée de glucose et d'un accepteur d'hydrogène comme l'acétylacétate ou l'oxygène ; la vitesse de l'acidité formée au début ne dépend pas de la qualité de ces derniers.

Néanmoins, l'acide acétylacétique qui est un oxydant faible arrête l'oxydation du glucose à l'acide lactique qu'il ne peut, à l'inverse de l'oxygène, transformer en acide pyruvique.

La cozymase que l'on trouve dans ce bacille joue, dans ces phénomènes, un rôle qui n'est pas encore éclairci.

En première approximation, il disparaît 1 molécule de glucose pour 1 molécule d'acétylacétate réduit ou 1 molécule d'oxygène consommé.

De la discussion, il ressort que le cycle de l'acide citrique est hors de cause dans cette glycolyse et que, si l'acide lactique et l'acide acétique en sont des étapes intermédiaires, il faudra chercher dans la formation de composés vraisemblablement phosphorylés, l'explication de produits de polymérisation comme le corps Y.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Identification des molécules par leurs spectres **Raman**.

VU ET APPROUVÉ LE 15 AVRIL 1942 :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

PAUL MONTEL

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

GILBERT GIDEL

39528. — ANC** IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, rue Cassette, Paris. — 1942.
